Juliana Risso Pariz

Efeito da suplementação de melatonina e cafeína nas características estruturais e funcionais de espermatozoides pré-criopreservação e pós-descongelamento

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutora em
Ciências

Versão corrigida segundo Resolução
CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011.

**São Paulo
2017**

Juliana Risso Pariz

Efeito da suplementação de melatonina e cafeína nas características estruturais e funcionais de espermatozoides pré-criopreservação e pós-descongelamento

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutora em
Ciências

Programa de Urologia

Orientador: Prof. Dr. Jorge Hallak

Versão corrigida segundo Resolução
CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011.

**São Paulo
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

© reprodução autorizada pelo autor

Pariz, Juliana Risso

Efeito da suplementação de melatonina e cafeína nas características estruturais e funcionais de espermatozoides pré-criopreservação e pós-descongelamento / Juliana Risso Pariz -- São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Urologia.

Orientador: Jorge Hallak.

Descritores: 1.Criopreservação 2.Sêmen 3.Espermatozoides 4.Cafeína 5.Melatonina 6.Motilidade espermática 7.Estresse oxidativo 8.Fragmentação de DNA 9.Mitocôndria

USP/FM/DBD-202/17

Agradecimentos

Ao Dr. Jorge Hallak, por todo incentivo e orientação no desenvolvimento do estudo e contribuição para o meu crescimento profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos.

À Disciplina de Urologia, pela oportunidade de realização do estudo.

À Androscience, pela parceria no trabalho, permitindo a realização do estudo.

Ao Dr. Don Evenson e a equipe do laboratório SCSA Diagnostics pelo treinamento do teste SCSA e colaboração no trabalho.

À Rosa Alice Casemiro Monteiro, pelo companheirismo na rotina do laboratório e apoio nesta jornada.

Às alunas do laboratório Androscience, que me permitem ensinar e aprender diariamente.

Conflito de interesse

Este projeto não apresenta nenhum conflito de interesse.

O desenvolvimento desta pesquisa ocorreu na Androscience – Laboratório de Referência em Andrologia, Criopreservação e Reprodução Humana, de maio de 2013 a maio de 2017.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	vii
Lista de símbolos	ix
Lista de figuras	x
Lista de tabelas	xi
RESUMO	xii
SUMMARY	xiii
I INTRODUÇÃO	14
1.1 Apresentação do problema	15
1.2 Revisão bibliográfica	18
II JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo geral	36
2.2 Objetivos específicos	36
III MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1. Desenho do estudo e pacientes	39
3.2. Coleta de amostra seminal	40
3.3. Análise seminal manual	41
3.3.1. Avaliação macroscópica das variáveis espermáticas	41
3.3.2. Avaliação microscópica das variáveis espermáticas	42
3.4. Criopreservação de líquido seminal	44
3.5. Descongelamento de amostras	45
3.6. Adição de substâncias	46
3.7. Análise dos parâmetros de motilidade por meio da análise assistida por computador	47
3.8. Testes funcionais dos espermatozoides	48
3.8.1. Avaliação da atividade mitocondrial	49
3.8.2. Dosagem de radicais livres de oxigênio	50
3.8.3. Avaliação do DNA espermático	51
3.9. Análise estatística	53
IV RESULTADOS	55
4.1. Perfil de pacientes	56
4.2. Análise seminal inicial e teste de descongelamento	56
4.3. Suplementação da amostra com melatonina e cafeína após criopreservação	60
V DISCUSSÃO	63
VI CONCLUSÕES	72
VIII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
ANEXO I	94
ANEXO II	95
ANEXO III	96
ANEXO IV	99
ANEXO V	100
ANEXO VI	101

ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variâncias
ATP	Adenosina trifosfato
CAF	Cafeína
CM	Cafeína e melatonina
CONT	Controle
DAB	3'3-diaminobenzidina
DFI	Taxa de fragmentação de DNA
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FAD	Flavina-adenina dinucleótido
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GPx	Glutathione peroxidase
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozoides, do inglês <i>Intracytoplasmic Sperm Injection</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HA	Hiperatividade
HTF	<i>Human tubal fluid</i>
IM	Espermatozoides imóveis
LIN	Índice de linearidade
Máx	Máximo
MEL	Melatonina
Mín	Mínimo
N ₂ L	Nitrogênio líquido
NAD	Dinucleotídeo nicotinamida-adenina
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo nicotinamida-adenina reduzido
NP	Motilidade não-progressiva
O ₂ ⁻	Ânion Superóxido

OH	Radical Hidroxila
OHCl	Radical Hipoclorito
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
PESA	Aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimo
PR	Motilidade progressiva
ROS	Radicais livres de oxigênio
SCSA	<i>Sperm chromatin structure assay</i>
SOD	Superóxido desmutase
STR	Índice de retidão
TESE	Extração de tecido testicular
TYB	<i>Test Yolk Buffer</i>
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
Vol.	Volume
VAP	Velocidade média do percurso
VCL	Velocidade curvilinear
VSL	Velocidade retilínea
WOB	Índice de oscilação

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	Centímetro
cpm	Fótons por minuto
°	Graus
°C	Graus Celsius
>	Maior
<	Menor
μl	Micrograma
μl	Microlitro
μm	Micrômetro
mm	Micrômetro
x10 ⁶	Milhões
ml	Mililitro
mM	Milimolar
m	minuto
%	Porcentagem
t	Tempo
g	Unidade de aceleração
x	Veze

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Gráfico sobre a interação entre taxa de congelamento, efeitos nocivos da solução criopreservada, formação de gelo intracelular e criossobrevivência	21
Figura 2.	Representação gráfica do congelamento lento	22
Figura 3.	Desenho do estudo	40
Figura 4.	Representação esquemática da suplementação das amostras	46
Figura 5.	Imagem da avaliação da atividade mitocondrial pela coloração 3,3'-diaminobenzidina, na qual o acúmulo de corante é proporcional à atividade mitocondrial do espermatozoide	50
Figura 6.	Imagem representativa da metodologia de classificação dos espermatozoides de acordo com a coloração adquirida pelos lasers FL1 e FL3 do citômetro de fluxo.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Frequência de motivos pelos quais os pacientes procuraram avaliação médica	39
Tabela 2.	Parâmetros de velocidade (progressivos, não progressivos e imóveis) e cinética avaliados pelo software <i>Sperm Computer Analysis</i>	48
Tabela 3.	Média e desvio padrão dos parâmetros seminais concentração (milhões/ml), motilidade progressiva (%) e motilidade total (%) de amostras seminais pré-criopreservação e pós-descongelamento	57
Tabela 4.	Média e desvio padrão dos parâmetros cinéticos velocidade curvilínea (VCL; $\mu\text{m/s}$), velocidade retilínea (VSL; $\mu\text{m/s}$), valor médio do percurso (VAP; $\mu\text{m/s}$), índice de linearidade (LIN; $\mu\text{m/s}$), índice de retidão (STR; $\mu\text{m/s}$), índice de oscilação (WOB; %), hiperatividade (%) de amostras pré-criopreservação e pós-descongelamento sem suplemento.....	58
Tabela 5.	Média e desvio padrão dos parâmetros de função espermática fragmentação de DNA (%), atividade mitocondrial (DAB; %), níveis de radicais livres de oxigênio (ROS; $\times 10^4 \text{ cpm}/20^6$) de amostras seminais pré-criopreservação e pós-descongelamento sem suplementação	59
Tabela 6.	Média e desvio padrão dos parâmetros seminais concentração (milhões/ml), motilidade progressiva (%) e motilidade total (%) e de amostras pós-descongelamento sem suplemento (CONT), suplementadas com cafeína (CAF), melatonina (MEL) ou cafeína + melatonina (CM)	60
Tabela 7.	Média e desvio padrão dos parâmetros cinéticos velocidade curvilínea (VCL; $\mu\text{m/s}$), velocidade retilínea (VSL; $\mu\text{m/s}$), valor médio do percurso (VAP; $\mu\text{m/s}$), índice de linearidade (LIN; $\mu\text{m/s}$), índice de retidão (STR; $\mu\text{m/s}$), índice de oscilação (WOB; %), hiperatividade (%) de amostras pós-descongelamento sem suplemento (CONT), com suplementação com cafeína (CAF), melatonina (MEL) ou cafeína + melatonina (CM)	61
Tabela 8.	Média e desvio padrão dos parâmetros funcionais fragmentação de DNA (%), atividade mitocondrial classe I (DAB I; %) classe II (DAB II; %), classe III (DAB III; %) e classe IV (DAB IV; %) e níveis de radicais livres de oxigênio (ROS; $\times 10^4 \text{ cpm}/20^6$) de amostras pós-descongelamento sem suplemento (CONT), com suplementação com cafeína (CAF), melatonina (MEL) ou cafeína + melatonina (CM)	62

RESUMO

Pariz JR. Efeito da suplementação de melatonina e cafeína nas características estruturais e funcionais de espermatozoides pré-criopreservação e pós-descongelamento. [Tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

A criopreservação de sêmen humano tem sido amplamente utilizada como método de preservação da fertilidade. A fim de reduzir os danos causados pelo processo de congelamento, diversos estudos utilizaram substâncias antioxidantes e estimulantes, porém, sua eficácia, bem como seu papel no controle funcional dos espermatozoides, não está bem estabelecida na literatura. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito da suplementação de melatonina e cafeína nas características estruturais e funcionais de espermatozoides pré-criopreservação e pós-descongelamento. Para isso, este estudo prospectivo utilizou 30 amostras seminais de pacientes entre 19 e 45 anos de idade da rotina do Laboratório Androscience entre maio de 2013 e maio de 2017. Todas as amostras foram classificadas como normozoospermicas, segundo análise seminal inicial de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS). Em seguida, as amostras foram criopreservadas com *Human Tubal Fluid* modificado sem suplemento ou com 2mM de melatonina. Após o descongelamento, as amostras foram analisadas ou suplementadas com 2 mM de cafeína, incubadas por 15 minutos. Ao final dos experimentos, obtivemos 4 grupos: Amostras pós-descongelamento sem suplementação (CONT), amostras suplementadas com cafeína (CAF), melatonina (MEL) e cafeína + melatonina (CM). Parâmetros seminais de contagem, motilidade e cinética, analisados pelos critérios da OMS e pelo software SCA®, a atividade mitocondrial, pela coloração por diaminobenzidina, avaliação da taxa de fragmentação de DNA, pelo método SCSA® e a dosagem dos níveis de radicais livres de oxigênio (ROS), pelo método de luminescência, foram realizados pré-criopreservação e pós-descongelamento com ou sem suplementação. Os dados foram analisados pelo teste T de Student pareado e pela análise de variâncias de uma via com medidas repetidas, seguida pelo pós-teste de Holm-Sidak, e adotado um alfa de 5%. Observamos redução significativa concentração espermática ($p<0,001$), motilidade total ($p<0,001$) e progressiva ($p<0,001$), parâmetros cinéticos ($p<0,009$) e atividade mitocondrial ($p<0,001$) e aumento das taxas de fragmentação de DNA ($p=0,046$) e ROS ($p=0,052$) nas amostras CONT quando comparadas com as amostras a fresco. Quando suplementadas com cafeína e melatonina, observamos aumento da motilidade progressiva nos grupos CAF ($p=0,005$) e CM ($p=0,048$) e aumento da atividade mitocondrial no grupo CM ($p<0,05$). Podemos concluir que a associação da suplementação com cafeína e melatonina nas amostras pré-criopreservação e pós-descongelamento demonstrou ser uma ferramenta importante para ser aplicada em amostras criopreservadas para atuarem como substâncias estimuladoras de motilidade espermática.

Descritores: Criopreservação, Sêmen, Espermatozoide, Cafeína, Melatonina, Motilidade espermática, Estresse oxidativo, Fragmentação de DNA, Mitocôndria.

SUMMARY

Pariz JR. Effect of melatonin and caffeine supplementation on the structural and functional characteristics of pre-cryopreservation and post-thaw spermatozoa [thesis] São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

Human semen cryopreservation has been widely used as a method of preserving fertility. In order to reduce the damages caused by the freezing process, several studies used antioxidant and stimulant substances, however, their efficiency as well as their role in the functional control of spermatozoa have not been well established in literature. Thus, the goal of this study was to investigate the effect of melatonin and caffeine supplementation on the structural and functional characteristics of pre-cryopreservation and post-thaw spermatozoa. For this, this prospective study used 30 seminal samples from patients aged from 19 to 45 years in the routine of the Androscience Laboratory between May 2013 and May 2017. All samples were classified as normozoospermic, according to the initial seminal analysis following criteria of the World Health Organization (WHO). Then, the samples were cryopreserved with modified Human Tubal Fluid without supplement or with 2 mM of melatonin. After thawing, the samples were analyzed or supplemented with 2 mM of caffeine, and incubated for 15 minutes. At the end of the experiments, we obtained 4 groups: Post-thaw samples without supplementation (CONT), samples supplemented with caffeine (CAF), melatonin (MEL) and caffeine + melatonin (CM). Seminal parameters for count, motility and kinetics, analyzed by WHO criteria and by the SCA[®] software, mitochondrial activity, by diaminobenzidine staining, evaluation of DNA fragmentation rate, by the SCSA[®] method, and dosage of radical oxygen species (ROS) levels, by the luminescence method, pre-cryopreservation and post-thaw were carried out with or without supplementation. The data were analyzed by the paired Student's t-test and by one-way analysis of variance with repeated measurements, followed by the Holm-Sidak post-test, adopting an alpha of 5%. We observed a significant reduction in sperm concentration ($p<0.001$), total ($p<0.001$) and progressive ($p<0.001$) motility, kinetic parameters ($p<0.009$) and mitochondrial activity ($p<0.001$), and increased rates of DNA fragmentation ($p=0.046$) and ROS ($p=0.052$) production in the CONT samples when compared with fresh sample. When supplemented with caffeine and melatonin, we observed an increase in progressive motility in the CAF ($p=0.005$) and CM ($p=0.048$) groups, and an increase in mitochondrial activity in CM group ($p<0.05$). We can conclude that the combination of caffeine and melatonin supplementation in pre-cryopreservation and post-thaw samples proved to be an important tool to be applied in cryopreserved samples to act as substances that stimulate sperm motility.

Descriptors: Cryopreservation, Semen, Spermatozoa, Caffeine, Melatonin, Sperm motility, Oxidative stress, DNA fragmentation, Mitochondria.

I. INTRODUÇÃO

1.1 Apresentação do problema

O destaque das pesquisas que envolvem a Medicina Reprodutiva, principalmente devido ao desenvolvimento das técnicas de Reprodução Assistida, possibilitou que hoje se atinja o sucesso na gestação de casais considerados inférteis (Steptoe e Edwards, 1978; Palermo et al., 1992). Por outro lado, os casos em que o indivíduo tem ou terá perda progressiva da fertilidade fez com que a criopreservação de gametas surgisse como uma ferramenta indispensável para a preservação da fertilidade desses indivíduos (Sherman, 1986; Song et al., 2010).

Criopreservação de sêmen humano como método de preservação da fertilidade tem sido utilizada em diversas situações, tais como: 1) antes de procedimentos cirúrgicos que possam prejudicar a fertilidade, como cirurgias que podem resultar em perda da função testicular ou disfunção ejaculatória (Williams, 2013; Sermondade et al., 2012) e, principalmente, 2) antes de tratamentos de quimioterapia, radioterapia e outras terapias imunossupressoras, que geralmente causam aplasia do tecido germinativo (Nangia et al., 2013; Williams, 2013). Mais recentemente, a criopreservação é utilizada no armazenamento de espermatozoides obtidos de pacientes azoospermicos após extração de tecido testicular (TESE) ou aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimo (PESA), evitando novos procedimentos cirúrgicos (Craft et al., 1995; Dohle et al., 1998; Meseguer et al., 2003; Williams, 2013). A criopreservação é também utilizada para armazenar as amostras seminais para serem utilizadas por casais inférteis e por pacientes com profissões de alto risco ou antes e após cirurgias de vasectomia (Glazier et al., 1999; Tomlinson et al., 2015). Apesar da criopreservação de sêmen ser um método eficaz, capaz de recuperar espermatozoides com potencial de fertilização e geração de crianças saudáveis, os danos causados por ela, tais como choque térmico, formação de cristais de

gelo intra e extracelular, desidratação e aumento da concentração intracelular de sal causado pelo choque osmótico (Stanic et al., 2000), podem prejudicar a integridade estrutural e funcional dos espermatozoides devido à ruptura irreversível das membranas plasmática e nuclear e desorganização das organelas celulares. Embora os mecanismos que resultem nos danos aos espermatozoides criopreservados sejam multifatoriais, a excessiva geração de radicais livres de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) é sugerida como o fator mais importante (Wang et al., 1997; Zribi et al., 2010).

Os espermatozoides são células com capacidade de geração de ROS, tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH), e os radicais de hipoclorito (OHCl) (de Lamirande, 1993). A produção de ROS pelos espermatozoides é um processo fisiológico, com papel importante na modulação de funções fundamentais para a fertilização como a capacitação, hiperativação e reação acrossômica (de Lamirande, 1993; Sharma e Agarwal, 1996); entretanto, o desequilíbrio causado tanto pelo aumento na produção de ROS quanto pela diminuição de agentes antioxidantes naturalmente presentes no líquido seminal resulta no processo denominado de estresse oxidativo. O estresse oxidativo compromete a qualidade funcional dos espermatozoides devido ao aumento da peroxidação lipídica de membranas, danos ao material genético e aumento da fragmentação de DNA, da apoptose e diminuição na atividade mitocondrial (Sharma e Agarwal, 1996; Aitken et al., 1989; Aitken et al., 1991; Duru et al., 2000; Fariello et al., 2012a).

No processo de criopreservação, danos ultraestruturais na membrana plasmática, acrossoma, peça intermédia e flagelos ocorrem devido ao inchaço da membrana, perda e/ou inchaço do acrossoma e prejuízo na bainha mitocondrial dos espermatozoides (Pedersen et al., 1971; Mahadevan e Trouson, 1984; Oettle e Soley, 1986). Estudos

sugerem que estas lesões são induzidas pela redução da temperatura, mas alguns têm chamado a atenção para a possível ligação entre a composição lipídica e a assimetria da membrana e as diferenças na resistência ao frio que pode ser observada entre espécies (De Leeuw et al., 1990). Ao avaliar a composição genética, estudos observaram mudanças na estrutura física da cromatina dos espermatozoides submetidos a criopreservação, com maior grau de desnaturação do DNA em condições ácidas após congelamento e descongelamento, além de sugerir que a cromatina destes espermatozoides apresenta um estado maior de condensação, que resulta na perda de capacidade de fertilização (Royere et al., 1988).

Em função dos achados, além das substâncias crioprotetoras usualmente utilizadas para minimizar os danos do processo de criopreservação dos espermatozoides, uma variedade de meios suplementados com antioxidantes tem sido avaliada a fim de amenizar os danos causados pelo congelamento. Esses suplementos apresentam função direta no controle do equilíbrio oxidativo do sêmen, reduzindo significativamente os níveis de ROS depois da criopreservação (Li et al. 2010). Como o estresse oxidativo afeta diretamente a motilidade dos espermatozoides possivelmente devido a danos mitocondriais (Hallak et al., 1998; Hallak et al., 1999; da Silva et al., 2010), a suplementação do meio de criopreservação com estimulantes, como a pentoxifilina, uma metilxantina, visa especificamente a recuperação da motilidade pós-descongelamento (Archer e Roudebush 2013).

Além das informações funcionais sobre a crioproteção em sêmen humano existentes serem limitadas, testes funcionais pós-descongelamento com a utilização de suplementos aos meios ainda são pouco utilizados. Por isso, uma revisão bibliográfica do efeito dos suplementos de interesse do presente estudo foi realizada.

1.2 Revisão bibliográfica

Uma revisão bibliográfica exploratória foi realizada para elaboração do presente estudo. A estratégia de busca contou com artigos indexados no banco de dados do Pubmed Central entre outubro de 2013 e maio de 2017, utilizando os descritores “*human sperm*”, “*sperm cryopreservation*”, “*reactive oxygen species*”, “*oxidative stress*”, “*sperm motility*”, “*sperm metabolism*”, “*sperm DNA*”, “*DNA integrity*”, “*melatonin*” e “*caffeine*”.

Considerações sobre criopreservação

Espermatozoides foram as primeiras células de mamíferos a serem criopreservadas com sucesso. Polge e colaboradores foram os pioneiros no estabelecimento do uso de glicerol, um soluto permeável que fornece proteção celular a baixas temperaturas, para a criopreservação de espermatozoides por tempo indeterminado (Polge et al. 1949). Em seguida, a criopreservação de espermatozoides de animais para a reprodução veterinária foi determinante para o desenvolvimento de técnicas e sua aplicação na reprodução humana assistida (Benson et al., 2012; Okuyama et al., 1990; Pursel e Johnson, 1975; Tada et al., 1990).

Existem diversos protocolos utilizados para a criopreservação de sêmen que podem se diferenciar pelo crioprotetor e método de congelamento (Agha-Rahimi et al., 2016; Bogle, 2017), sendo o congelamento lento o método amplamente utilizado e adotado em nosso estudo (Sherman, 1986). Neste tipo de criopreservação, a amostra é resfriada em etapas gradativas, iniciando em 36,7 graus *Celsius* (°C), até atingir os -196°C. O nitrogênio líquido, meio no qual as amostras são submersas e armazenadas a -196°C, é capaz de destruir células vivas em segundos ou preservá-las por décadas, sem atividade bioquímica detectável, sendo o resultado final dependente do método de

processamento da célula (Sherman, 1986). Conhecimentos básicos das causas de morte celular, especialmente durante o processo de congelamento, e a descoberta de métodos que previnem estas causas (Gilmore et al., 1995; Hallak et al., 2000a), tem levado a aplicações práticas de armazenamento de células e tecidos por um longo período de tempo.

Durante o processo físico de congelamento lento, a água tende a se cristalizar envolvendo as células, enquanto que a concentração de soluto extracelular aumenta. Um gradiente de concentração é então estabelecido e a água intracelular se desloca para fora da célula em resposta à força osmótica. No decorrer do congelamento, a célula torna-se relativamente desidratada, os sais podem concentrar-se para níveis extremamente elevados e, de um modo semelhante, a razão ácido-base da solução é alterada (Benson, 2012). Esta desidratação pode afetar a organização celular e mecanismos moleculares, resultar em colapso dos componentes intracelulares ou ruptura destes componentes pelos cristais de gelo (Pedersen e Lebech, 1971). A criopreservação pelo método lento surgiu para prevenir estes danos celulares causados pela água.

Inicialmente, toda amostra seminal é processada e adicionada o crioprotetor que, além de proteger as células dos danos causados pela criopreservação, diminuem o ponto de congelamento da amostra, induzindo a desidratação em níveis controlados e evitando a formação de cristais de gelo intracelular. Esta etapa é realizada a 36,7°C (Sherman, 1986; Stanic et al., 2000). Diversos crioprotetores são descritos na literatura, mas a sua escolha depende do tipo de célula, concentração de crioprotetor, toxicidade e tempo de equilíbrio entre a célula e a substância protetora (Gilmore et al., 1995). No presente estudo, foi utilizado o *Test Yolk Buffer* (TYB, Irvine Scientific, Estados Unidos), que, além de TES, Tris, Dextrose e sulfato de gentamicina, contém gema de ovo em sua

composição, importante para evitar a desidratação das células (Gilmore et al., 1995). Ao comparar e avaliar a motilidade e a morfologia dos espermatozoides e a integridade da membrana antes da criopreservação e depois do descongelamento em dois meios de crioproteção - TYB vs. glicerol, concluiu-se que os espermatozoides criopreservados em TYB tiveram motilidade, viabilidade e morfologia normais superiores àqueles criopreservados em glicerol puro (Hallak et al., 2000a).

Logo após a adição do crioprotetor, é realizada a etapa de equilíbrio a 4°C, no qual os espermatozoides interagem com o meio e o crioprotetor e adquirem maior resistência aos danos causados pela criopreservação (Sherman, 1986; Stanic et al., 2000). Durante esse período, ocorre o equilíbrio osmótico entre o meio intracelular espermático e extracelular, formado por todos os componentes osmoticamente ativos presentes no meio diluidor (Benson et al., 2012; Stanic et al., 2000). A água extracelular congela, no momento em que a célula se aproxima do ponto de congelamento, removendo o líquido extracelular, fato que acarreta um aumento de osmolaridade (Benson et al., 2012; Stanic et al., 2000). Com esse desequilíbrio osmótico, a água é retirada da célula para o compartimento extracelular, ocasionando uma diminuição do volume celular. Se eles são congelados de maneira lenta, sofrem um dano por excessiva desidratação da célula; se congelados muito rápido, os espermatozoides não perdem água suficiente, provocando a formação de cristais de gelo dentro dela, com consequentes danos irreversíveis (Figura 1; (Benson et al., 2012; Mazur et al., 1972). A taxa de congelamento deve, então, ser suficientemente lenta para permitir a saída de água de dentro da célula por osmose, prevenindo, assim, o gelo intracelular, e suficientemente rápida para minimizar os danos pela exposição prolongada a concentrações altas de solutos (Benson et al., 2012; Mazur et al., 1972). Sendo assim, uma adequada desidratação celular depende da velocidade do congelamento de forma a não provocar uma lise da célula (Benson et al., 2012; Mazrur

et al., 1972). Portanto, para evitar o dano celular, mesmo com uma velocidade de descongelamento controlada, há necessidade do emprego de crioprotetores (Benson et al., 2012; Gilmore et al., 1995).

FONTE: Benson JD. Theriogenology, v. 78, p. 1682-1699, 2012, modificado.

Figura 1. Gráfico sobre a interação entre taxa de congelamento, efeitos nocivos da solução criopreservada, formação de gelo intracelular e criossobrevivência. Em baixas taxas de criopreservação, os efeitos da solução são os fatores dominantes na lesão celular, mas com o aumento da velocidade de congelamento e redução do tempo de exposição, estes efeitos são minimizados. Por outro lado, ao aumentar a velocidade de congelamento, a formação de cristais de gelo intracelulares torna-se o fator dominante de lesão celular. A combinação destes dois efeitos significa que haverá uma curva em forma de “U” invertido e demonstra que, ao adotar uma metodologia de criopreservação, é importante considerar uma velocidade de congelamento ideal para minimizar os efeitos nocivos à integridade da célula.

A próxima etapa da criopreservação é considerada a fase de transição de temperatura, na qual a amostra fica em contato com o vapor de nitrogênio, aproximadamente -79°C , para que se dê início ao congelamento. Por fim, a amostra é mergulhada em nitrogênio líquido, a uma temperatura de -196°C para manutenção da amostra por tempo indeterminado (Figura 2) (Sherman, 1986; Stanic et al., 2000).

FONTE: Arquivo pessoal

Figura 2. Representação gráfica do congelamento lento. No tempo inicial (T0), é adicionado o *Test Yolk Buffer*, (TYB; Irvine Scientific, USA), seguido pela fase de equilíbrio a 4°C por 5 minutos. Na fase de transição de temperatura, a amostra é mantida a -79°C (vapor de nitrogênio) por 60 minutos. As amostras são mantidas em nitrogênio líquido (-196°C) por tempo indefinido. Fonte: Arquivo pessoal

Em resumo, podemos considerar como desvantagens da criopreservação o (I) choque térmico, (II) formação de cristais de gelo, (III) desidratação celular e (IV) aumento da concentração intracelular de sal causado pelo choque osmótico. Estas alterações apresentam influência direta na redução da motilidade e vitalidade espermática, danos mitocondriais e nas membranas plasmática e acrossômica e aumento da geração de ROS, fragmentação de DNA, peroxidação lipídica e apoptose (Alvarez e Storey 1992; da Silva et al., 2010; Royere et al., 1996; Zribi et al., 2010). Ainda, considera-se que o sucesso da criopreservação depende da velocidade do congelamento, composição da solução onde as células são congeladas e preservação das características funcionais dos

espermatozoides (Benson et al., 2012; Gilmore et al., 1995; Mazur et al., 1972; Stanic et al., 2000). Visto que, de 25 a 75% dos espermatozoides criopreservados não sobrevivem ou apresentam danos funcionais (Hallak et al., 1998; Hallak et al., 1999), espera-se que a otimização dos processos de criopreservação com suplementos possa aumentar os índices de viabilidade espermática pós-descongelamento.

Considerações sobre balanço oxidativo

O excesso de ROS pode alterar a capacidade fértil do sêmen devido sua capacidade de alterar as membranas espermáticas, reduzindo a motilidade e capacidade de fusão espermatozoide-oócito, e por agir diretamente no DNA espermático (Aitken et al., 1989; Aitken et al., 1991; Aitken e Iullis, 2010; Duru et al., 2000; Jones et al., 1978; Kodama et al., 1997; Sharma e Agarwal, 1996).

Os espermatozoides são células suscetíveis à ação dos ROS devido ao seu citoplasma reduzido e a composição de suas membranas, ricas em ácidos graxos poli-insaturados, que contém ligações duplas entre carbonos e um átomo de hidrogênio (H) que se ligam facilmente aos ROS, iniciando uma cascata oxidativa altamente prejudicial ao desenvolvimento de funções espermáticas (Aitken e Clarkson 1987; de Lamirande, 1993; Sharma e Agarwal, 1996). São relacionados como ROS o H_2O_2 , o O_2^- e os OHCl, e definidos como átomos ou moléculas de oxigênio que possuem um ou mais elétrons desemparelhados na camada de valência, conferindo a elas alta capacidade reativa (de Lamirande, 1993). Estudos sugerem relação entre a qualidade do sêmen e a presença de ROS gerada pelo excesso de leucócitos seminais e presença de citoplasma residual espermático (Huszar et al., 1997). Quando a espermatogênese é prejudicada por algum motivo, os mecanismos de extrusão citoplasmático são comprometidos e os

espermatozoides liberados do epitélio germinativo carregam citoplasma residual, também nomeadas como gotas citoplasmáticas (Huszar et al., 1997). As gotas citoplasmáticas apresentam atividade metabólica, estando intensamente relacionadas com a geração de ROS através de mecanismos mediados pela enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). A G6PD controla a taxa de fluxo de glicose e, conseqüentemente, a disponibilidade intracelular de fosfato de dinucleotídeo nicotinamida-adenina reduzido (NADPH), no qual é usado como uma fonte de elétrons pelos espermatozoides para a geração de ROS, por um sistema enzimático conhecido como NADPH oxidase (Aitken et al., 1997). Portanto, a atividade metabólica do citoplasma residual, representada pela atividade da G6PD, resulta na produção excessiva de NADPH e, conseqüentemente, na produção excessiva de ROS (Aitken et al., 1997). Adicionalmente, quantidades anormalmente elevadas de leucócitos no sêmen, devido a processos infecciosos, são outras fontes de geração de ROS (Aitken e West, 1990; Athayde et al., 2007; Villegas et al., 2003).

Em quantidades fisiológicas, os ROS têm um papel importante na modulação de funções como capacitação, hiperativação e reação acrossômica, entretanto, a fim de proteger os espermatozoides contra as ações das ROS e conseqüente estresse oxidativo, o plasma seminal conta com diversas substâncias antioxidantes, que podem ser enzimáticas, como a superóxido desmutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (GPx) e não enzimáticas, como a vitamina E (Alvarez et al., 1987; Ramakrishnan et al., 2007). O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de ROS e a capacidade antioxidante e resulta na peroxidação lipídica das membranas celular e mitocondrial, com conseqüente redução na capacidade de produção de energia, fragmentação de DNA e morte celular (Aitken e Clarkson 1987; Aitken et al., 1989; Aitken et al., 1991; Duru et al., 2000; Fariello et al., 2012a; Sharma e Agarwal, 1996).

Existem evidências de fontes externas de estresse oxidativo como xenobióticos, poluição (Athayde et al., 2007), obesidade (Fariello et al., 2012a, Tunc et al., 2011), tabagismo (Fariello et al., 2012b), varicocele (Cocuzza et al., 2012), além de aumento de ROS com a idade (Cocuzza et al., 2008), fatores dos quais são relacionados com infertilidade masculina.

Métodos de preparação laboratorial *in vitro* para Reprodução Assistida podem causar danos que podem prejudicar a capacidade fértil da amostra seminal. Em geral, pacientes subférteis apresentam excesso de produção de ROS devido à presença de células redondas, incluindo neutrófilos, macrófagos e espermátides, e ainda por interferências ambientais (Aitken e West, 1990; Fedder et al., 1993). A centrifugação da amostra, procedimento comum em todos os laboratórios de Reprodução Assistida e frequente no preparo para a criopreservação de amostra seminal, pode aumentar o risco de danos pelos OH e superóxido e citocinas produzidas pelos leucócitos (Tulandi e Gosden, 2004). Sendo assim, o processamento de espermatozoides pré-criopreservação e pós-descongelamento necessita de atenção especial, respeitando as características iniciais da amostra (Agarwal e Saleh, 2002). Ainda, a osmolaridade normal da amostra deve ser restaurada pós-descongelamento com um meio de cultura, e isto deve ser realizado muito lentamente para permitir a mudança gradual osmótica e minimizar o estresse na célula (Henry et al., 1993; Tulandi e Gosden, 2004).

Considerações sobre motilidade e metabolismo celular

Os espermatozoides são células flagelares, com movimento próprio e metabolicamente ativas, que realizam tanto a glicólise como a respiração mitocondrial para a geração de energia em forma de adenosina trifosfato (ATP), mantendo um

adequado balanço energético necessário para o transporte e as demais funções celulares (Piomboli et al., 2012). A morfologia espermática, composta por cabeça com pouco citosol, peça intermediária rica em mitocôndrias e cauda, favorece a sua função de mobilidade até a fecundação do oócito (Luo et al., 2013).

As mitocôndrias dos espermatozoides possuem características morfológicas e bioquímicas peculiares. Primeiramente, as mitocôndrias presentes na peça intermediária são organizadas em torno do axonema, (Eddy et al., 2003; Krisfalusi et al., 2006), estritamente associadas entre si (Calvin et al., 1981; Ursini et al., 1999) e possuem isoformas específicas de proteínas e isoenzimas, como o citocromo c (Goldberg et al., 1977), subunidade VIb do citocromo C oxidase (Huttemann et al., 2003), lactato desidrogenase (LDH-X ou LDH-C4) (Blanco & Zinkham, 1963) e E1-piruvato descarboxilase (Gerez de Burgos et al., 1994). Além das mitocôndrias, existem enzimas glicolíticas distribuídas ao longo da cauda do espermatozoide, sendo algumas dessas enzimas isoformas ajudam as proteínas a serem ancoradas na bainha fibrosa (Bunch et al., 1998; Vemuganti et al., 2007). Portanto, os espermatozoides possuem dois mecanismos de produção de energia, a fosforilação oxidativa mitocondrial e glicólise, ativados de acordo com a necessidade com base em diferentes condições e estágios de fertilização (Peterson e Freund, 1970; Piomboni et al., 2012). Mesmo ainda não totalmente elucidado, acredita-se que o processo de fosforilação oxidativa nas mitocôndrias que resulta na formação de uma molécula ATP seja a principal fonte de energia para a motilidade espermática (Piomboni et al., 2012), uma vez que a morfologia espermática favorece este mecanismo devido à disposição de mitocôndrias ao redor da região proximal do flagelo da peça intermediária, sendo possível que um aumento no seu comprimento seja associado a uma maior taxa de fosforilação oxidativa, e assim com

maior atividade metabólica influenciando na motilidade ou vitalidade da célula (Luo et al. 2013; Piomboni et al. 2012).

Fisiologicamente, a fosforilação oxidativa inicia-se com a entrada de uma molécula de piruvato, proveniente da glicólise, ou de ácido graxo na mitocôndria e, a partir de então, moléculas de ATP são formadas a cada fase. A motilidade espermática então é gerada pela produção constante de ATP pelas mitocôndrias localizadas na peça intermediária do espermatozoide, com a participação das coenzimas dinucleotídeo de nicotinamida-adenina (NAD) e flavina-adenina dinucleotídeo (FAD) e citocromo C (Piomboni et al. 2012; Turner 2003). Este processo de geração de energia depende da manutenção de um potencial eletrolítico entre o ambiente intra e extra-mitocondrial, que por sua vez requer uma membrana mitocondrial íntegra e com permeabilidade seletiva (Bourgeron 2000).

Sendo assim, as mitocôndrias têm um importante papel na espermatogênese, diferenciação, reação acrossômica, fusão com oócito e fertilização, uma vez que a funcionalidade da atividade mitocondrial está positivamente correlacionada com a capacidade e qualidade de fertilização (Otasevic et al. 2013). Os principais determinantes para a funcionalidade mitocondrial espermática são ativação e expressão de componentes da cadeia transportadora de elétrons e potencial de membrana. Muitas proteínas e enzimas, como a subunidade VIb do citocromo C oxidase, El-piruvato descarboxilase e a creatina quinase, permitem modular a função mitocondrial em diferentes estágios da fertilização (Shih et al. 2014). Estudos relatam que o aumento da motilidade espermática necessita de aumento da capacidade respiratória na mitocôndria, suportando, assim, a hipótese do papel da fosforilação oxidativa na motilidade espermática de pacientes

normozoospermicos e, paralelamente, o distúrbio no mecanismo de produção de energia pode ser responsável pela astenozoospermia (Ferramosca et al. 2012).

A motilidade espermática é uma característica funcional importante avaliada na análise seminal básica descrita pela Organização Mundial da Saúde (OMS; World Health Organization; 2010), visto que a probabilidade de se estabelecer gravidez espontânea aumenta de acordo com a qualidade da progressão espermática e diminuição da proporção de espermatozoides imóveis (Bostofte et al., 1983; Bostofte et al., 1984). O valor mínimo determinado pela OMS para espermatozoides com motilidade progressiva (espermatozoides que possuem motilidade linear rápida ou lenta) é acima de 32%, sendo diagnosticada a astenozoospermia em amostras com valores inferiores a 32% (World Health Organization, 2010).

Os aspectos dos movimentos dos espermatozoides, como velocidade de progressão e tipo de movimento, demonstraram estar correlacionados com a penetração dos espermatozoides no muco cervical (Aitken et al., 1986a; Mortimer et al., 1986), penetração em ovo de hamster, ciclos de inseminação intrauterina (IIU) e fertilização *in vitro* (Jeulin et al., 1986). Especificamente, descobriu-se que as mensurações objetiva e quantitativa das características dos movimentos dos espermatozoides são preditivas da capacidade funcional de fertilização dessas células (Aitken et al., 1986a; Jeulin et al., 1986; Mortimer et al., 1986). Consequentemente, tem-se dado atenção especial para a avaliação das características dos movimentos dos espermatozoides, mais do que para a simples determinação da porcentagem de espermatozoides móveis.

As características cinéticas dos espermatozoides podem ser avaliadas por metodologias computadorizadas com significado biológico valioso que permitem a mensuração da: (i) velocidade curvilínea, calculada a partir da soma das trajetórias

lineares, que se unem a posições sequenciais da cabeça dos espermatozoides ao longo da trajetória dos espermatozoides; (ii) linearidade, calculada por meio da relação entre as velocidades curvilínea e linear, representando a trajetória linear de um espermatozoide em sua trajetória curvilínea inata, ao longo do tempo; (iii) retinidade, que representa o tempo médio da velocidade da cabeça do espermatozoide ao longo da linha reta entre a primeira e última posição detectada; (iv) amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide, calculada a partir das amplitudes dos desvios laterais da cabeça do espermatozoide sobre o eixo de progressão, (v) hiperatividade, movimento que fornece ao espermatozoide maior propulsão para atravessar o *cumulus*, zona pelúcida e fertilizar o oócito (Huang e Lu, 2007; Lu, 2013; Mortimer, 2015).

Considerações sobre integridade do DNA espermático

A análise seminal clássica, que avalia a concentração, motilidade e morfologia espermática, foi considerada por muito tempo o padrão-ouro para a avaliação da fertilidade masculina, porém, amostras consideradas normais frequentemente apresentavam redução ou falhas de fertilização (Evenson, 2016; Pizzol, 2014). Além disso, o desenvolvimento de técnicas de Reprodução Assistida, especificamente a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI, do inglês *Intracytoplasmic Sperm Injection*), apresenta taxas de sucesso de aproximadamente 30% mesmo em amostras seminais que não apresentam defeito aparente (Bungum et al., 2011). Por sua vez, a nomeada "infertilidade idiopática", causas de infertilidade masculina não investigadas e/ou diagnosticadas, sugeria que mecanismos de regulação da espermatogênese e função espermática poderiam estar envolvidos na redução do potencial fértil masculino (Bungum et al., 2011).

A avaliação da integridade do DNA espermático surgiu como a principal ferramenta para prever o potencial fértil seminal (Bungum et al., 2011) adicionalmente à avaliação seminal clássica, uma vez que existe uma correlação inversamente proporcional entre taxas de fragmentação de DNA e taxa de fertilidade (Evenson 2016). Diversas metodologias foram desenvolvidas para avaliar a integridade do DNA, sendo as mais utilizadas o ensaio cometa, eletroforese em gel que avalia espermatozoides individualmente (Morris et al., 2002); o método de marcação de "nicks" por dUTP e deoxinucleotidil terminal transferase (TUNEL, do inglês *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) (Gorczyca et al., 1993), método de detecção de fragmentação de DNA através da marcação da ponta terminal dos ácidos nucleicos; Halosperm[®], teste que, após a desnaturação ácida e a remoção de proteínas nucleares, espermatozoides com DNA fragmentado apresentam um aspecto de halo disperso em torno da cabeça (Evenson e Wixon, 2005); e o ensaio da estrutura da cromatina espermática (do inglês *Sperm chromatin structure assay*; SCSA), que avalia a razão entre DNA de fita simples ou dupla- corados por laranja de acridina e avaliados por citometria de fluxo (Evenson et al., 1985). Especificamente no SCSA, cinco mil espermatozoides são avaliados individualmente e os dados são convertidos e analisados em citogramas produzidos pelo software do teste, de modo que o eixo x do citograma representa a fluorescência vermelha que cora DNA de cadeia simples, ou seja, quanto maior o valor de x, maior a fragmentação de DNA dos espermatozoides da amostra. O eixo y representa a fluorescência verde que cora espermatozoides com cromatina normal, sendo adotado o 75% como valor limite entre cromatina normal e anormal. Os dados brutos do citograma são convertidos pelo SCSA software, transformando-os em um painel que determina a porcentagem de espermatozoides com DNA normal, DNA com taxa de fragmentação (DFI%) moderada e alto índice de fragmentação para aplicação clínica do teste (Evenson

et al., 1985; Evenson, 2016). O SCSA determina o DFI<30% para a reprodução natural e sugere que amostras com DFI> 40% devem ser encaminhadas para a realização de ICSI (Bungum et al., 2007).

A fragmentação do DNA espermático *in vivo* pode ser induzida por seis mecanismos principais: (i) apoptose durante a espermatogênese; (ii) alterações na cadeia de DNA durante a remodelação da cromatina durante a espermatogênese; (iii) fragmentação de DNA pós-testicular induzida por ROS durante o transporte através dos túbulos seminíferos e epidídimo; (iv) fragmentação de DNA induzida por caspases endógenas e endonucleases; (v) induzida por radioterapia e quimioterapia; (vi) induzida por substâncias tóxicas exógenas (Sakkas et al., 2010). Os procedimentos *in vitro* de criopreservação de sêmen tem sido relacionados com aumento das taxas de fragmentação da DNA espermático, uma vez que a produção excessiva de ROS durante o procedimento de criopreservação resulta em aumento de subprodutos da peroxidação lipídica das membranas celulares que se ligam ao DNA espermático através da oxidação de bases de DNA (principalmente guanossina) ou pela interação direta destes subprodutos com a sequência de DNA, resultando na sua fragmentação (Blumer et al., 2008; Guthrie e Welch, 2012; Kodama et al., 1997; Wang et al., 1997). Além disso, observa-se um estado de condensação da cromatina alterada em amostras pós-descongelamento, reduzindo a capacidade de fertilização dos espermatozoides (Royere et al., 1988; Royere et al., 1996).

Considerações sobre melatonina como suplemento de ação antioxidante

A melatonina, hormônio produzido pela glândula pineal e frequentemente associada com a função de controle do ritmo circadiano dependente da luz, exerce papel regulatório sobre diversos eventos fisiológicos, metabólicos e comportamentais. Devido

a suas propriedades endócrinas, a melatonina modula funções adicionais como a eliminação de radicais livres, imunomodulação mediada por reparação de DNA, cicatrização de feridas e sinalização endócrina secundária (Kleszczynski et al., 2011). Além disso, sua função inclui relação com a produção de hormônios sexuais, espermatogênese e função antioxidante (Awad et al., 2006; Succu et al., 2011). A melatonina também aumenta a atividade do complexo I e IV da cadeia de transporte de elétrons, potencializando a respiração mitocondrial e a síntese de ATP (Succu et al., 2011). Por fim, o estímulo dos mecanismos protetores e reparadores do DNA realizados pela melatonina se dão respectivamente por sua ação antioxidante e por sua atuação na ativação de vias de reparo do DNA (DNA polimerase e DNA ligase) (Aitken e Roman, 2008; Kleszczynski, et al., 2011). Presente no plasma seminal e nos espermatozoides, que possuem sítios de ligação para este hormônio (Awad et al., 2006; Luboshitzky et al., 2002), a melatonina controla mecanismos celulares, exercendo papel protetor contra os danos oxidativos na mitocôndria devido a suas propriedades antioxidantes e ação direta com os ROS (Succu et al., 2011).

Estudos *in vitro* com sêmen de diversas espécies de animais indicam que a incubação com melatonina apresentou efeitos benéficos, como aumento significativo da porcentagem de motilidade progressiva, reduzindo simultaneamente a porcentagem de espermatozoides imóveis (du Plessis et al., 2010; Ortiz et al., 2011); redução da peroxidação lipídica de membrana de espermatozoides de javalis e garanhões (da Silva et al., 2011; Jang et al., 2010), prevenção da capacitação e efeitos apoptóticos, com aumento da fertilidade em amostras de carneiros (Casao et al., 2010); e proteção dos espermatozoides de búfalo contra os ROS e melhora da qualidade do sêmen após os processos de congelamento e descongelamento (Li et al., 2012).

Apesar de ser conhecido que a melatonina é um potente antioxidante com efeitos protetores aos espermatozoides, poucas são as informações na literatura sobre seu efeito durante a criopreservação de sêmen humano (Karimfar et al., 2015). Por esta razão, avaliar o efeito da suplementação de melatonina nas características estruturais e funcionais dos espermatozoides de amostras seminais criopreservadas é de grande interesse.

Considerações sobre cafeína como suplemento de suposta ação estimulante

Substância presente na dieta da população brasileira, a ação da cafeína no sêmen também tem sido investigada. A cafeína, da família das metilxantinas, é considerada uma droga psicotrópica e sua ingestão está relacionada com aumento do risco de aborto espontâneo e redução da fertilidade feminina (Klonoff-Cohen et al., 2002), porém, estas associações permanecem controversas. Por outro lado, estudos prévios realizados por nosso grupo indicam um aumento da motilidade espermática (Sobreiro et al., 2005) de homens que ingerem cinco xícaras ou mais de café por dia. De fato, dados da literatura demonstram que a ingestão de cafeína pode ter efeitos benéficos na motilidade e concentração espermática, além de aumentar os níveis de testosterona sérica, mas sem melhora significativa nas taxas de fertilização (Klonoff-Cohen et al., 2002; Jensen et al., 2010). Estudos em animais relatam ainda que a adição de cafeína na amostra seminal aumenta a motilidade e estimula a capacitação e reação acrossômica espontânea dos espermatozoides (Yamaguchi e Funahashi, 2012). A cafeína atua como inibidora da enzima fosfodiesterase, responsável pela quebra da adenosina monofosfato cíclico (AMPc), desencadeando um aumento na concentração de AMPc espermático permitindo que o metabolismo energético dos espermatozoides se eleve. Como na criopreservação,

um dos fatores envolvidos no decréscimo da capacidade fertilizante dos espermatozoides é o desgaste energético, o potencial aumento da concentração de energia no interior do espermatozoide causada pela cafeína merece ser investigada em humanos (Aitken et al., 1986b; Garbers et al., 1971).

Apesar da ampla utilização da criopreservação de espermatozoides e o conhecimento de seus efeitos deletérios na função espermática, as técnicas de criopreservação não melhoraram ao longo dos anos (Hallak et al., 2000a; Hallak et al., 2000b). Acredita-se que as ROS são envolvidas na diminuição da qualidade seminal durante a criopreservação (Wang et al., 1997; Zribi et al., 2010) e as tentativas de reduzir os efeitos do estresse oxidativo durante a criopreservação tem sido focada, principalmente, na adição de antioxidantes nos meios de cultura (Esteves et al., 2007; Kessopoulou et al., 1995; Suleiman et al., 1996; Greco et al., 2005; Lafuente et al., 2013; Agarwal et al., 2014). Resultados divergentes da suplementação com antioxidantes e estimulantes são comuns na literatura e atribuídos a uma diversidade de fatores que incluem diferenças espécie-específicas, tipo de substância utilizada e sua concentração. Além disso, o exato mecanismo de ação destas substâncias nos espermatozoides ainda não está completamente esclarecido. Desta forma, avaliar os efeitos da criopreservação do ponto de vista funcional dos espermatozoides, com ou sem a adição de substâncias antioxidantes e estimulantes, pode contribuir para o entendimento dos efeitos deletérios da criopreservação.

II. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

II. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Apesar da criopreservação de sêmen ser amplamente utilizada como um método de preservação de fertilidade, a eficácia da suplementação de substâncias como antioxidantes e estimulantes, como melatonina e cafeína, ainda não está totalmente estabelecida na literatura.

Além disso, a produção excessiva de ROS está positivamente correlacionada com a concentração, motilidade e morfologia anormais. Nos casos de oligozoospermia, 40% das amostras apresentam níveis elevados de ROS, possivelmente associados a mecanismos de defesa insuficientes e comprometimento da função espermática (Sharma, 1996). Adicionalmente, suspensões com alta quantidade de espermatozoides imóveis produzem grande quantidade de ROS (Klonoff-Cohen et al. 2002). Devido às diferenças apresentadas na qualidade inicial de cada amostra, surge a necessidade de um estudo que avalie não só os efeitos da criopreservação e a adição de antioxidantes, mas também o comportamento de cada grupo frente a estas condições.

2.1 Objetivo geral

- Avaliar o efeito da suplementação de melatonina e cafeína nas características estruturais e funcionais dos espermatozoides pré-criopreservação e pós-descongelamento.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o efeito da suplementação de melatonina pré-criopreservação na motilidade espermática;

- Determinar o efeito da suplementação de melatonina pré-criopreservação nas características funcionais dos espermatozoides;
- Determinar o efeito da suplementação de cafeína pós-descongelamento na motilidade espermática;
- Determinar o efeito da suplementação de cafeína pós-descongelamento nas características funcionais dos espermatozoides.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Desenho do estudo e pacientes

Trata-se de um estudo prospectivo que utilizou amostras seminais de 30 indivíduos, entre 19 e 45 anos de idade, da rotina do Laboratório Androscience (**ANEXO I**), assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (**ANEXO II e ANEXO III**), no período compreendido entre maio de 2013 e maio de 2017. Os motivos pelos quais os indivíduos procuraram avaliação médica e realizaram a análise seminal estão representados na Tabela 1.

Tabela 1. Frequência de motivos pelos quais os pacientes procuraram avaliação médica.

	n	%
<i>Check up</i>	15	50,0
<i>Pré-vasectomia</i>	5	16,7
Infertilidade	3	10,0
Ejaculação precoce	2	6,7
Disfunção erétil	2	6,7
Dor testicular	1	3,3
Pós-reversão de vasectomia	1	3,3
Varicocele	1	3,3
	30	100%

De acordo com os valores mínimos necessários e suficientes para uma amostra conseguir estabelecer uma gestação (percentil 5%; WHO, 2010), foram incluídas no estudo apenas amostras normozoospermicas, ou seja, que não tinham alterações seminais (**ANEXO IV**). Após esta seleção inicial, cada amostra foi subdividida de acordo com a substância a ser adicionada ao meio de criopreservação, conforme o organograma a seguir:

Figura 3: Desenho do estudo.

Foram excluídos pacientes que apresentarem azoospermia, leucocitospermia e outras alterações seminais. Após a execução dos protocolos de pesquisa, todas as amostras foram descartadas.

Os experimentos foram realizados no Laboratório Androscience, mediante autorização de ambas as partes envolvidas.

3.2. Coleta de amostra seminal

As amostras de sêmen foram obtidas por masturbação, após um período de 2 a 7 dias de abstinência ejaculatória (WHO, 2010), em frasco de polipropileno estéril e descartável, em área anexa ao laboratório. Todos os parâmetros espermáticos foram testados dentro de uma hora após a ejaculação, à temperatura de 36,7°C. Uma alíquota da amostra fresca foi submetida à análise seminal convencional para a rotina do laboratório,

e, em seguida, a amostra remanescente foi utilizada para os procedimentos de criopreservação e testes funcionais do estudo.

3.3. Análise seminal manual

Após a liquefação, a análise seminal foi realizada de acordo com as recomendações da OMS, publicadas no manual para exame e processamento de sêmen humano (WHO, 2010).

3.3.1. Avaliação macroscópica das variáveis espermáticas

A avaliação macroscópica do ejaculado foi feita mediante a verificação da cor (normal: branco-opaco). Uma cor amarelada poderia ser sugestiva de infecção; avermelhada, poderia denotar presença de hemácias; enquanto que translúcida, poderia significar uma concentração espermática muito baixa. O volume do ejaculado foi medido por aspiração de toda a amostra com o auxílio de uma pipeta graduada acoplada a um pipetador eletrônico.

A viscosidade foi verificada (se normal ou alterada) pipetando-se a amostra de sêmen e observando-se a extensão do filamento. Uma extensão superior a 2,0 cm foi considerada alterada, enquanto que, se normal, o sêmen deveria sair ponteira da pipeta em gotas. As amostras foram acondicionadas em uma placa aquecida, à temperatura de 36,7°C, por 30 minutos, para que se procedesse à liquefação seminal antes da avaliação da concentração espermática e de outros parâmetros. O pH do sêmen liquefeito foi determinado mediante a colocação de uma gota de sêmen sobre papel sensível ao pH e mediante a comparação da cor, após 30 segundos, com a fita de calibragem. O intervalo

de tempo entre a coleta de uma amostra de sêmen e sua avaliação inicial foi de cerca de 60 minutos. Quaisquer irregularidades nessas etapas iniciais fariam com que a amostra fosse descartada, acarretando a não realização da análise. As variáveis volume, tempo de liquefação, cor, viscosidade, pH não foram utilizadas em nosso estudo por não serem avaliadas após o descongelamento das amostras.

3.3.2. Avaliação microscópica das variáveis espermáticas

Após a avaliação das variáveis macroscópicas, a amostra foi manualmente homogeneizada, agitando-se cuidadosamente o frasco coletor por cerca de cinco segundos. Foram adicionados 5 microlitros (μl) da amostra em câmara de Makler (Sperm Counting Chamber, Sefi-Medical Instruments, Israel) para observação em microscópio com magnificação de 20 vezes (x) (Eclipse E400, Nikon, Japão). Os seguintes parâmetros microscópicos foram avaliados: número total de espermatozoides móveis progressivos (milhões), número total de espermatozoides móveis (milhões), número total de espermatozoides (milhões), concentração de espermatozoides (milhões/ml), motilidade progressiva (%), motilidade total (%) e concentração de células redondas (milhões) (WHO, 2010).

3.2.2.1. Determinação da concentração espermática

A concentração espermática foi determinada através da câmara de contagem Makler. A câmara possui uma profundidade de 0,01 mm e marcação graduada de 100 quadrados, cada um com 0,1mm x 0,1mm. O volume compreendido na área de 10 quadrados é de $0,001\text{mm}^3$ ou milhão por ml. Sendo assim, a leitura direta da concentração da amostra de sêmen ($10^6/\text{ml}$) foi realizada pela simples contagem dos espermatozoides

presentes na área de uma linha (dez quadrados) e os resultados expressos em milhões de espermatozoides por mililitro (ml) de amostra seminal.

3.2.2.2. Número total de espermatozoides

O número total de espermatozoides no sêmen foi determinado pela multiplicação do resultado da concentração espermática pelo volume ejaculado ml.

$$\text{Nº Total de espermatozoides} = \text{Concentração de espermatozoides} \times \text{volume}$$

O número total de espermatozoides móveis no sêmen foi determinado pela multiplicação do número de espermatozoides móveis ($\times 10^6/\text{ml}$) pelo volume ejaculado em mililitro.

$$\text{Nº Total de espermatozoides móveis} = \text{Concentração de espermatozoides móveis} \times \text{volume seminal}$$

3.2.2.3. Motilidade espermática

A avaliação da motilidade quantitativa e qualitativa foi realizada na câmara de Makler, em magnificação de 200x. Esse procedimento foi realizado duas vezes, sendo que em casos de diferença superior a 10% entre as duas avaliações, uma terceira contagem foi necessária. Foram avaliados 100 espermatozoides em cada contagem e os resultados expressos em porcentagem.

Os espermatozoides avaliados foram distribuídos em categorias de acordo com o grau de movimentação, e classificados como:

- Espermatozoides progressivos - Espermatozoides que se movem em sentido direcional (deslocam em uma direção)

- Espermatozoides não-progressivos - Espermatozoides que se movem, mas não se deslocam.
- Espermatozoides imóveis - Espermatozoides sem motilidade

3.2.2.4. Morfologia espermática

A avaliação da morfologia espermática realizada em lâmina com esfregaço seminal. Após a secagem à temperatura ambiente, o esfregaço foi corado utilizando-se o kit de coloração panótico rápido, seguindo as instruções do fabricante. Duzentas células espermáticas foram avaliadas utilizando-se microscopia óptica (magnificação de 1000x). Segundo o critério da OMS, para que um espermatozoide seja considerado normal a cabeça do espermatozoide deve medir entre 4,0 e 5,0 μm de comprimento e 2,5 e 3,5 μm de largura, sem defeitos grosseiros da cauda ou peça intermediária. A peça intermediária é considerada normal quando inferior a 1 μm e a cauda deve ter comprimento aproximado de 45 μm .

3.4. Criopreservação de líquido seminal

O “*TEST-Yolk Buffer*” (TYB; Invirne Scientific, Estados Unidos) foi utilizado como meio de criopreservação do sêmen em todas as amostras deste estudo. O TYB é uma combinação de TES [189 mM N-Tris (hidroximetil) ácido sulfônico metil-2-aminoetano] e TRIS [85 mM Tris (hidroximetil) aminoetano], juntos com 20% de gema inativada (vol./vol.), 12% glicerol (vol./vol.), 11 mM dextrose, 0,25mg/ml de estreptomicina e 0,15mg/ml de penicilina em pH = 7,35. Os frascos do TYB permaneceram armazenados refrigerados a -20°C e descongelados em banho-maria (Fanem, Brasil) a 36,7°C por 20 minutos para serem utilizados.

Para recuperar espermatozoides progressivos (PR) antes da criopreservação, foi realizado um processamento seminal (ISolate; Irvine Scientific, Estados Unidos). Após centrifugação (400g, 10 minutos), foi retirada parte do sobrenadante e adicionado TYB, *Human Tubal Fluid* (HTF) modificado (Irvine Scientific, Estados Unidos) e soro substituto sintético (SSS; Irvine Scientific, Estados Unidos) na mesma proporção da amostra (1:1). Para cada amostra, duas alíquotas foram criopreservadas, sendo uma alíquota sem qualquer suplementação e outra com melatonina (MEL) adicionada ao HTF modificado (Figura 4). As amostras foram distribuídas em tubos estéreis e cilíndricos de plástico, com capacidade de 2ml (Nunc cryovials, Estados Unidos).

Todas as amostras foram submetidas ao congelamento lento, no qual, após o processamento do protocolo de criopreservação, foram refrigeradas por 5 minutos (-20°C), uma hora no vapor de nitrogênio (-79°C) e depois mergulhadas no nitrogênio líquido (N₂L; -196°C) (Sherman, 1986).

3.5. Descongelamento de amostras

Para a análise pós-descongelamento, cada um dos frascos da amostra de sêmen foi removido do nitrogênio líquido e descongelado em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foram colocados em uma incubadora a 36,7°C, onde permaneceram por 20 minutos e divididas em duas alíquotas. Removeu-se o meio crioprotetor pela diluição da amostra descongelada em meio de HTF modificado (1:2, vol./vol.), por 5 minutos a uma centrifugação de 400g (Henry et al., 1993). O mesmo procedimento foi repetido para a remoção completa do meio crioprotetor e o sedimento resultante foi ressuspensionado em 0,5 ml de HTF modificado sem suplementação ou com adição de HTF

modificado suplementado com 2 mM de cafeína (CAF) e incubados por 15 minutos (Figura 4).

Os parâmetros de descongelamento foram avaliados para determinação da concentração e da motilidade e testes de função espermática.

3.6. Adição de substâncias

As amostras foram suplementadas com substâncias antioxidantes, antes da criopreservação, e estimulantes, após o descongelamento, para avaliação de seus efeitos através de testes que determinam a capacidade funcional dos espermatozoides:

- Melatonina: 2 mM, concentração determinada com base nos valores descritos na literatura (du Plessis et al., 2010);
- Cafeína: 2 mM, concentração determinada com base em estudo piloto (Pariz e Hallak, 2016; **ANEXO VI**).

Ao fim do estudo, quatro grupos foram formados, de acordo com a Figura 4.

Figura 4. Representação esquemática da suplementação das amostras.

3.7. Análise dos parâmetros de motilidade por meio da análise assistida por computador

A análise seminal assistida por computador é um sistema automatizado, desenvolvido para promover informações precisas e significativas sobre concentração, viabilidade e morfologia espermática, fornecendo uma análise estatística sobre a população espermática baseada nas informações da análise macroscópica, desenvolvimento de imagens contínuas do espermatozoide e processamento digital, realizada com o auxílio de uma câmera acoplada a um microscópio óptico e um computador (Mortimer et al., 2015).

As velocidades espermáticas foram medidas por meio do sistema de análise espermática assistida por computador (Sperm Computer Analysis – SCA; Microptic, Barcelona, Espanha). Para isso, 5µl de sêmen foram adicionados a câmara de Makler (Sperm Counting Chamber, Sefi-Medical Instruments, Israel), colocada em um microscópio de contraste de fase (Nikon Eclipse E200™, Tokio, Japão) em uma magnificação de 100x. O microscópio estava conectado a uma câmera de vídeo (Eclipse E400, Nikon, Japão) para a captura de imagens. As imagens foram analisadas pelo SCA (Microptics, S.L. versão 5.1, Barcelona, Espanha).

Foram avaliados parâmetros de velocidade (progressivos, não progressivos e imóveis) e cinética, descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros de velocidade (progressivos, não progressivos e imóveis) e cinética avaliados pelo software *Sperm Computer Analysis – SCA* (Microptic®).

Parâmetro avaliado	Sigla	Definição
Motilidade progressiva (%)	PR	Espermatozoides que se movem em sentido direcional (deslocam em uma direção).
Motilidade não-progressiva (%)	NP	Espermatozoides que movem, mas sem deslocamento.
Imóveis (%)	IM	Espermatozoides sem motilidade.
Velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$)	VCL	Velocidade em tempo médio da cabeça do espermatozoide ao longo de seu trajeto curvilíneo. É uma medida do vigor celular.
Velocidade retilínea ($\mu\text{m/s}$)	VSL	Tempo médio da velocidade da cabeça do espermatozoide ao longo da linha reta entre a primeira e última posição detectada.
Velocidade média do percurso ($\mu\text{m/s}$)	VAP	Tempo médio da velocidade da cabeça do espermatozoide ao longo de seu trajeto. Esse índice é calculado utilizando a trajetória curvilínea de acordo com algoritmos no módulo Motilidade SCA.
Índice de linearidade (%)	LIN	A linearidade de um trajeto curvilíneo, VSL / VCL
Índice de oscilação (%)	WOB	Medida de oscilação do trajeto real sobre o caminho médio, VAP / VCL .
Índice de retidão (%)	STR	Linearidade do caminho médio, VSL / VAP
Hiperatividade (%)	HA	Movimento que fornece ao espermatozoide maior propulsão para atravessar o <i>cumulus</i> , zona pelúcida e fertilizar o oócito.

FONTE: Mortimer, 2015

Se uma trajetória de movimento do espermatozoide é regular e linear, a velocidade média do percurso (VAP) é quase idêntica à velocidade retilínea (VSL), ou seja, quanto maior a irregularidade do movimento espermático, maior a diferença entre VAP e VSL. Consequentemente, a oscilação (WOB), linearidade (LIN), retidão (STR), deslocamento lateral da cabeça (ALH) e batimento cruzado (BCF) podem ser prejudicados pela redução da VSL e aumento da VAP (Mortimer et al., 2015).

3.8. Testes funcionais dos espermatozoides

Foram realizados testes funcionais pré-criopreservação e pós-descongelamento para avaliar a capacidade funcional espermática.

3.8.1. Avaliação da atividade mitocondrial – DAB

A atividade mitocondrial foi avaliada pelo método de coloração por 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Fariello et al., 2012a; Hrudka, 1987). Esta técnica baseia-se na oxidação da 3,3'-diaminobenzidina pela enzima citocromo C oxidase, onde o reagente é polimerizado e depositado na bainha mitocondrial ao longo da peça intermediária dos espermatozoides.

Inicialmente, uma alíquota de sêmen fresco foi adicionada em uma solução contendo 1mg/ml de DAB em tampão fosfato-salino (PBS; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄, pH=7,4, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) em uma proporção de 1:1 a 1:3 e incubada por 60 minutos em banho-maria a 36,7°C no escuro. Após o período de incubação, foram preparados 2 esfregaços de 10µl em lâminas de microscopia (Exacta, China). Depois de secas, as lâminas foram fixadas em formaldeído 10% por 10 minutos. As lâminas foram então lavadas com água destilada e deixadas em temperatura ambiente para secarem novamente.

Foram contadas 200 células observadas em microscópio equipado com contraste de fase (Eclipse E200, Nikon, Japão) em uma magnificação 1000x em imersão e a classificação foi realizada de acordo com a escala de classes proposta por Hrudka (Hrudka 1987): classe I (100% da peça intermediária corada), classe II (mais de 50% da peça intermediária corada), classe III (menos de 50% da peça intermediária corada) e classe IV (ausência de coloração na peça intermediária), como ilustrado na Figura 5.

FONTE: Pariz e Hallak, 2016.

Figura 5. Imagem da avaliação da atividade mitocondrial pela coloração 3,3'- diaminobenzidina, na qual o acúmulo de corante é proporcional à atividade mitocondrial do espermatozoide. Os espermatozoides foram classificados de acordo com os critérios descritos por Hrudka(Hrudka 1987) como classe I (DAB I; 100% da peça intermediária corada), classe II (DAB II; mais de 50% da peça intermediária corada), classe III (DAB III; menos de 50% da peça intermediária corada) e classe IV (DAB IV; ausência de coloração na peça intermediária). Magnificação de 1000x em óleo de imersão.

3.8.2. Dosagem de radicais livres de oxigênio

Na análise de radicais livres de oxigênio (ROS) foi medida a quantidade de luz que os espermatozoides apresentam quando em contato com uma sonda quimioluminescente (luminol), através do uso de um luminômetro sensível (Bertold, Alemanha). O luminol é um pobre quimioluminescente que reage com várias espécies reativas de oxigênio (H_2O_2 , $OH^\cdot$, $O_2^\cdot$). O resultado é a emissão de luz proporcional aos níveis de ROS presentes nas amostras de plasma seminal.

Quatrocentos microlitros de sêmen foram adicionados a 20 µL de solução de luminol [5 mM de luminol em 400 µL de DMSO (Sigma Aldrich, Estados Unidos)]. A quimioluminescência foi medida por 15 minutos a 36,7°C. A média dos resultados dos tubos foi subtraída do resultado do tubo controle contendo HTF modificado, resultando em um valor ΔT . Os resultados foram expressos em fótons contados por minutos (cpm), pelo seguinte cálculo (Athayde et al., 2007).

$$ROS = \Delta T \times 20 \times 10^6 \text{espermatozoides} / \text{Concentração de espermatozoides}$$

3.8.3. Avaliação do DNA espermático

A avaliação da integridade do DNA espermático foi realizada pelo método *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA[®]) descrito por Evenson (Evenson et al., 1985).

Uma alíquota de sêmen foi diluída em 200 µl de TNE buffer (0,15 M NaCl, 0,01 M Tris-HCl, 0,001 M de EDTA, pH=7,4; Sigma-Aldrich, Estados Unidos) para uma concentração de $1-2 \times 10^6$ espermatozoides/ml. Foram adicionados 400 µl de solução ácido-detergente (0,08 N HCl, 0,15 M NaCl, 0,1% Triton X 100, pH=1,2, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) e, após exatos 30 segundos, as células foram coradas pela adição de 1,2 ml de solução de laranja de acridina [6,0 µg de laranja de acridina (Polysciences Inc, Estados Unidos), 0,037 M de ácido cítrico, 0,126 M Na₂HPO₄, 0,0011 M EDTA, 0,15 M NaCl, pH=6 (Sigma-Aldrich, Estados Unidos)]. Três minutos após o procedimento ter iniciado, 5000 espermatozoides foram avaliados em citômetro de fluxo (BD FACS Calibur). Os dados foram inseridos no software SCSA para o cálculo da taxa de fragmentação de DNA (DFI%) e índice de maturação de espermatozoides (%HDS; Figura 7), de acordo com a coloração emitida nos lasers FL1 e FL3.

FONTE: Evenson, 2016

Figura 6. Imagem representativa da metodologia de classificação dos espermatozoides de acordo com a coloração adquirida pelos lasers FL1 e FL3 do citômetro de fluxo. A figura (A) representa um gráfico “dot plot” com dados de 5000 espermatozoides adquiridos pelo citômetro de fluxo e a representação das populações, de acordo com o grau de fragmentação de DNA. O eixo x representa a captura de células com DNA fragmentado pelo laser vermelho (FL3) e o eixo y representa a captura de células com cromatina normal pelo laser verde (FL1). A figura (B) representa a conversão dos dados pelo software SCSA, em que transcreve os dados do “dot plot” em um histograma e define as taxas de fragmentação de DNA (DFI).

3.9. Análise estatística

A comparação entre as amostras pré-criopreservação e pós-descongelamento foi realizada a fim de descrever os efeitos da criopreservação. Os grupos cafeína, melatonina e cafeína + melatonina foram comparados ao grupo pós-descongelamento, com o objetivo de avaliar o efeito destas suplementações na qualidade seminal após o descongelamento das amostras.

Sendo assim, as amostras foram avaliadas considerando duas situações:

- (I) Pré-criopreservação, no qual a partir de uma amostra coletada, há um processamento para o congelamento. Este processo resulta em alteração de volume seminal e perda de espermatozoides, com alterações esperadas nos parâmetros volume, número total de espermatozoides progressivos, número total de espermatozoides móveis e número total de espermatozoides. Portanto, estes parâmetros não foram analisados por testes estatísticos;
- (II) Suplementação de amostras com cafeína e melatonina, a partir de amostras já processadas, considerando as amostras pós-descongelamento sem adição de suplementos como amostra controle. Nesta situação, o volume da amostra é constante (estabelecida como 0,5 ml).

Para a comparação dos efeitos deletérios da criopreservação (situação I) foi utilizado o teste T de *Student* pareado.

O método estatístico para comparar a suplementação das amostras (situação II) foi a análise de variâncias (ANOVA) de uma via com medidas repetidas, seguida pelo pós-

teste de Holm-Sidak, sempre comparando com as amostras com o grupo controle pós-descongelamento. Nesta situação, foram considerados os parâmetros número total de espermatozoides móveis progressivos, número total de espermatozoides móveis, concentração, motilidade progressiva, motilidade total, e atividade mitocondrial.

Para todo o estudo foi adotado um alfa de 5%.

IV. RESULTADOS

4.1. Perfil de pacientes

Foram incluídos 30 pacientes, com idade média de 33,74 anos [desvio padrão (DP)= $\pm 7,36$ anos], sendo a idade mínima de 22 anos e máxima de 45 anos.

4.2. Análise seminal inicial e teste de descongelamento

As médias, desvio padrão, valor mínimo e máximo dos parâmetros seminais iniciais pré-criopreservação (amostra fresca) e pós-descongelamento (controle) estão expostos na Tabela 3. As 30 amostras incluídas seguiram os seguintes critérios: motilidade progressiva acima de 32% e/ou motilidade total acima de 50%. A média da morfologia espermática normal foi de 10,03% (DP $\pm 4,57$). Amostras com células redondas e/ou leucocitospermia foram excluídas. Os dados foram analisados pelo teste T de *Student* pareado.

É possível observar os efeitos negativos do processo de criopreservação na qualidade móvel dos espermatozoides, visto que a motilidade progressiva e total apresentaram redução significativa no grupo pós-descongelamento ($p < 0,001$; Tabela 3). A variação da concentração espermática ($p = 0,015$) entre os grupos avaliados ($62,48$ vs. $18,13 \times 10^6$ ml; $p < 0,001$) é considerada normal, consequência da manipulação e centrifugação da amostra.

Tabela 3. Média e desvio padrão dos parâmetros seminais concentração (milhões/ml), motilidade progressiva (%) e motilidade total (%) de amostras seminais pré-criopreservação e pós-descongelamento.

	Pré-criopreservação	Pós-descongelamento	p
Concentração (milhões/ml)			
Média; DP	62,48; 47,32	18,13; 11,94	<0,001
Mín-Máx	22,00-240,00	1,90-45,00	
Motilidade progressiva (%)			
Média; DP	50,22; 10,96	7,50; 2,71	<0,001
Mín-Máx	35,00-75,00	0,00-50,00	
Motilidade total (%)			
Média; DP	66,09; 8,94	16,13; 12,27	<0,001
Mín-Máx	50,00-90,00	0,00-50,00	

Média; Desvio Padrão (DP)

Mín-Máx: Valores mínimo e máximo

*p<0,05 teste T de Student pareado

O processo da amostra para a criopreservação e descongelamento resulta em alteração no volume seminal e perda de espermatozoides e, por isso, o volume seminal, número total de espermatozoides progressivos, número total de espermatozoides móveis e número total de espermatozoides não foram analisados por testes estatísticos.

Na análise seminal assistida por computador, observamos redução da velocidade de curvatura, velocidade linear, velocidade média, índice de linearidade, índice de retidão e índice de oscilação nas amostras pós-descongelamento quando comparadas às amostras pré-criopreservação (Tabela 4; $p < 0,05$). Não observamos diferença estatística na hiperatividade entre os grupos pré-criopreservação e pós-descongelamento ($p = 0,07$).

Tabela 4. Média e desvio padrão dos parâmetros cinéticos velocidade curvilínea (VCL; $\mu\text{m/s}$), velocidade retilínea (VSL; $\mu\text{m/s}$), valor médio do percurso (VAP; $\mu\text{m/s}$), índice de linearidade (LIN; $\mu\text{m/s}$), índice de retidão (STR; $\mu\text{m/s}$), índice de oscilação (WOB; %), hiperatividade (%) de amostras pré-criopreservação e pós-descongelamento sem suplemento.

	Pré-criopreservação	Pós-descongelamento	p
Velocidade curvilínea (VCL; $\mu\text{m/s}$)			
Média; DP	55,69; 10,89	29,47; 20,27	<0,001
Mín-Máx	5,80-69,00	0,00-64,33	
Velocidade retilínea (VSL; $\mu\text{m/s}$)			
Média; DP	19,45; 7,70	7,61; 8,97	0,002
Mín-Máx	11,58-40,14	0,00-32,58	
Valor médio do percurso (VAP; $\mu\text{m/s}$)			
Média; DP	30,66; 8,12	14,12; 11,43	<0,001
Mín-Máx	0,00-37,38	24,23-58,46	
Índice de linearidade (LIN; %)			
Média; DP	34,54; 9,53	20,34; 15,01	0,005
Mín-Máx	24,23-58,46	0,00-63,19	
Índice de retidão (STR; %)			
Média; DP	62,27; 9,50	21,86; 18,63	<0,001
Mín-Máx	50,45-82,38	0,00-67,61	
Índice de oscilação (WOB; %)			
Média; DP	54,70; 6,66	41,90; 15,62	0,009
Mín-Máx	47,62-70,96	0,00-72,50	
Hiperatividade (%)			
Média; DP	7,97; 7,46	2,47; 6,83	0,073
Mín-Máx	0,90-25,75	0,00-25,00	

Média; Desvio Padrão (DP)

Mín-Máx: Valores mínimo e máximo

* $p < 0,05$ teste T de *Student* pareado

Na tabela 5, podemos observar a redução da atividade mitocondrial (DAB), com redução de DAB I e aumento de DAB III nas amostras pós-descongelamento quando comparadas às pré-criopreservação ($p < 0,001$). As amostras pós-descongelamento apresentaram maiores níveis de radicais livres de oxigênio ($p = 0,052$) e fragmentação de DNA ($p = 0,046$). Não houve diferença estatística no DAB II e DAB IV entre os grupos avaliados ($p > 0,05$; Tabela 5).

Tabela 5. Média e desvio padrão dos parâmetros de função espermática fragmentação de DNA (%), atividade mitocondrial (DAB; %), níveis de radicais livres de oxigênio (ROS; $\times 10^4$ cpm/20⁶) de amostras seminais pré-criopreservação e pós-descongelamento sem suplementação.

	Pré-criopreservação	Pós-descongelamento	p
Fragmentação de DNA (%)			
Média; DP	36,86; 15,29	47,93; 18,09	0,046
Mín-Máx	12,00-64,00	11,00-92,00	
DAB I (%)			
Média; DP	26,19; 15,61	9,43; 7,23	<0,001
Mín-Máx	4,00-66,00	0,00-23,00	
DAB II (%)			
Média; DP	47,62; 17,39	51,48; 12,18	0,418
Mín-Máx	3,00-24,00	28,00-71,00	
DAB III (%)			
Média; DP	11,67; 5,54	21,19; 7,84	<0,001
Mín-Máx	6,00-44,00	3,00-24,00	
DAB IV (%)			
Média; DP	12,95; 8,92	18,04; 10,94	0,106
Mín-Máx	2,00-38,00	3,00-42,00	
Radicais livres de oxigênio			
(x10 ⁴ cpm/20 ⁶)			
Média; DP	0,919; 0,759	3,218; 4,936	0,052
Mín-Máx	0,200-3,110	0,031-19,535	

Média; Desvio Padrão (DP)

Mín-Máx: Valores mínimo e máximo

* $p < 0,05$ teste T de *Student* pareado

4.3. Suplementação das amostras com melatonina e cafeína

Na Tabela 6 estão descritos as médias, desvio padrão, valor mínimo e máximo dos parâmetros seminais das amostras pós-descongelamento sem suplemento (CONT), suplementadas com cafeína (CAF), melatonina (MEL) ou cafeína+melatonina (CM). Foram incluídas 30 amostras, pareadas e analisadas pelo teste ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguido pelo pós-teste de Holm-Sidak.

Podemos observar que a suplementação de amostras pós-descongelamento com cafeína sugere que esta substância é eficaz no estímulo da motilidade espermática, atuando tanto sozinha quanto associada à melatonina. Observamos aumento da motilidade progressiva ($p < 0,05$) nas amostras CAF e CM quando comparados ao grupo CONT (Tabela 6). Não observamos efeito das suplementações nos parâmetros concentração espermática e motilidade total ($p > 0,05$).

Tabela 6. Média e desvio padrão dos parâmetros seminais concentração (milhões/ml), motilidade progressiva (%) e motilidade total (%) e de amostras pós-descongelamento sem suplemento (CONT), suplementadas com cafeína (CAF), melatonina (MEL) ou cafeína + melatonina (CM).

	CONT	CAF	MEL	CM	p valor		
					CONT x CAF	CONT x MEL	CONT x CM
Concentração (milhões/ml)							
Média; DP	16,95; 10,91	18,19; 10,82	21,05; 14,83	21,62; 14,90	0,662	0,497	0,166
Mín-Máx	1,90-45,00	4,00-39,00	5,00-69,00	5,00-67,00			
Motilidade progressiva (%)							
Média; DP	7,50; 2,71	13,27; 2,62	9,49; 8,28	16,54; 13,25	0,005	0,980	0,048
Mín-Máx	0,00-50,00	0,00-50,00	0,00-23,70	0,00-44,00			
Motilidade total (%)							
Média; DP	16,72; 12,31	20,24; 13,02	19,94; 11,84	24,80; 15,08	0,466	0,813	0,078
Mín-Máx	0,00-50,00	0,00-50,00	5,00-40,00	0,00-50,00			

Média; Desvio Padrão (DP)

Mín-Máx: Valores mínimo e máximo

* $p < 0,05$ Anova + Holm-Sidak

Ao se avaliar as características cinéticas dos espermatozoides após suplementação, não observamos diferenças estatisticamente significantes nas amostras quando comparadas ao grupo sem suplementação ($p > 0,05$; Tabela 7).

Tabela 7. Média e desvio padrão dos parâmetros cinéticos velocidade curvilínea (VCL; $\mu\text{m/s}$), velocidade retilínea (VSL; $\mu\text{m/s}$), valor médio do percurso (VAP; $\mu\text{m/s}$), índice de linearidade (LIN; $\mu\text{m/s}$), índice de retidão (STR; $\mu\text{m/s}$), índice de oscilação (WOB; %), hiperatividade (%) de amostras pós-descongelamento sem suplemento (CONT), com suplementação com cafeína (CAF), melatonina (MEL) ou cafeína + melatonina (CM).

	CONT	CAF	MEL	CM	p valor		
					CONT x CAF	CONT x MEL	CONT x CM
Velocidade curvilínea (VCL; $\mu\text{m/s}$)							
Média; DP	39,53; 18,48	41,53; 20,71	37,81; 18,43	46,38; 21,87	0,999	1,000	0,626
Mín-Máx	10,14-64,33	15,33-109,11	15,49-60,45	13,84-97,63			
Velocidade retilínea (VSL; $\mu\text{m/s}$)							
Média; DP	11,60; 10,49	10,67; 6,16	7,80; 5,48	16,62; 19,03	1,000	0,961	0,729
Mín-Máx	0,82-32,58	0,82-21,43	2,69-14,82	0,70-58,22			
Valor médio do percurso (VAP; $\mu\text{m/s}$)							
Média; DP	19,96; 11,53	19,47; 10,30	16,85; 10,14	26,09; 18,09	1,000	0,989	0,462
Mín-Máx	3,79-37,38	2,47-49,14	7,20-29,33	1,55-59,23			
Índice de linearidade (LIN; %)							
Média; DP	26,35; 26,69	24,44; 5,00	18,51; 5,16	30,81; 23,28	1,000	0,899	0,693
Mín-Máx	4,68-63,19	5,36-29,92	12,71-26,48	5,09-83,11			
Índice de retidão (STR; %)							
Média; DP	51,07; 17,38	52,69; 7,04	43,45; 6,28	54,38; 19,85	1,000	0,917	0,926
Mín-Máx	11,11-87,16	33,33-59,34	36,74-56,31	40,31-98,30			
Índice de oscilação (WOB; %)							
Média; DP	48,75; 10,90	45,68; 5,54	42,17; 6,37	52,25; 14,85	0,946	0,866	0,669
Mín-Máx	34,35-72,50	16,08-52,87	34,61-49,23	11,18-84,55			
Hiperatividade (%)							
Média; DP	4,35; 9,17	2,37; 1,80	0,78; 0,90	1,23; 1,61	0,995	0,929	0,966
Mín-Máx	0,00-25,00	0,00-5,36	0,00-2,41	0,00-9,09			

Média; Desvio Padrão (DP)

Mín-Máx: Valores mínimo e máximo

* $p < 0,05$ Anova + Holm-Sidak

As amostras CM apresentaram aumento da atividade mitocondrial mensurada através do método de coloração com DAB, uma vez que houve aumento do DAB classe I ($p < 0,001$) e redução do DAB classe IV ($p < 0,001$; Tabela 8). Não houve diferença estatística na avaliação da fragmentação de DNA espermático e níveis de ROS nas amostras avaliadas ($p > 0,05$).

Tabela 8. Média e desvio padrão dos parâmetros funcionais fragmentação de DNA (%), atividade mitocondrial classe I (DAB I; %) classe II (DAB II; %), classe III (DAB III; %) e classe IV (DAB IV; %) e níveis de radicais livres de oxigênio (ROS; $\times 10^4$ cpm/20⁶) de amostras pós-descongelamento sem suplemento (CONT), com suplementação com cafeína (CAF), melatonina (MEL) ou cafeína + melatonina (CM).

					p valor		
	CONT	CAF	MEL	CM	CONT x CAF	CONT x MEL	CONT x CM
Fragmentação de DNA (%)							
Média; DP	47,93; 18,09	43,67; 18,00	45,07; 22,56	44,13; 23,26	0,901	0,995	0,988
Mín-Máx	11,00-92,00	9,00-96,00	10,00-97,00	11,00-97,00			
DAB I (%)							
Média; DP	8,27; 6,95	13,18; 10,35	11,68; 10,60	19,14; 13,44	0,155	0,526	0,001
Mín-Máx	0,00-23,00	0,00-36,00	0,00-42,00	3,00-48,00			
DAB II (%)							
Média; DP	50,00; 12,09	52,82; 11,07	51,45; 13,65	53,23; 12,88	0,902	1,000	0,945
Mín-Máx	28,00-71,00	31,00-72,00	7,00-69,00	20,00-73,00			
DAB III (%)							
Média; DP	21,95; 7,86	19,45; 8,03	19,54; 10,74	17,77; 6,62	0,846	0,967	0,230
Mín-Máx	6,00-44,00	2,00-35,00	8,00-63,00	5,00-33,00			
DAB IV (%)							
Média; DP	19,90; 10,74	16,36; 10,26	17,31; 5,59	10,00; 5,51	0,580	0,489	<0,001
Mín-Máx	3,00-42,00	2,00-45,00	0,00-34,00	4,00-24,00			
Radicais livres de oxigênio							
(x10 ⁴ cpm/20 ⁶)							
Média; DP	2,94; 4,62	2,95; 4,43	1,81; 2,17	2,52; 2,57	1,00	0,849	0,998
Mín-Máx	0,03-19,54	0,02-17,95	0,00-12,73	0,00-9,74			

Média; Desvio Padrão (DP)

Mín-Máx: Valores mínimo e máximo

* $p < 0,05$ Anova + Holm-Sidak

V. DISCUSSÃO

Criopreservação de sêmen como método de preservação de espermatozoides tem sido utilizada em diversas situações, tais como antes de procedimentos cirúrgicos que possam prejudicar a função testicular ou resultar disfunção ejaculatória e, principalmente, antes de tratamentos de quimioterapia, radioterapia e outras terapias imunossupressoras, que geralmente causam aplasia do tecido germinativo (Sermondade et al., 2011; Nangia et al., 2013; Williams, 2013). Mais recentemente, este método é utilizado no armazenamento de espermatozoides obtidos de pacientes azoospermicos após extração de tecido testicular ou aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimo, evitando novos procedimentos cirúrgicos e por casais inférteis em procedimentos de fertilização *in vitro* (Craft et al., 1995; Dohle et al., 1998; Glazier et al., 1999; Meseguer et al., 2003; Tomlinson et al., 2015; Williams, 2013).

Apesar da criopreservação de sêmen ser um método eficaz, seu prejuízo na qualidade seminal pós-descongelamento é bem definido (Stanic et al., 2000; Wang et al., 1997; Zribi et al., 2010). Estudos sugerem que lesões celulares são induzidas pela redução da temperatura, mas alguns têm chamado a atenção para a possível ligação entre a composição lipídica das membranas celulares e as diferenças na resistência ao frio que pode ser observada entre espécies (Stanic et al., 2000; Wang et al., 1997; Zribi et al., 2010). Para elucidar estas informações, nosso estudo utilizou o método de congelamento lento e o glicerol como crioprotetor e comparou os parâmetros seminais das amostras pré-criopreservação e pós-descongelamento. De fato, apesar de manter as amostras potencialmente férteis, o processo de criopreservação implicou em efeitos negativos que: (I) reduziram a concentração espermática, resultado esperado, pois parte da amostra é perdida ao longo do procedimento, (II) reduziram a motilidade e atividade mitocondrial;

(III) aumentaram os níveis de ROS nas amostras e (IV) aumentaram a fragmentação de DNA espermático. É importante salientar que todas as amostras incluídas neste trabalho eram normozoospermicas (WHO, 2010), compatíveis com reprodução natural.

A motilidade espermática é um dos principais parâmetros seminais afetado e relatado em diversos estudos que envolvem criopreservação. Assim como Hallak e colaboradores (Hallak et al. 1998), que demonstraram que a criopreservação reduziu aproximadamente 50% da motilidade de espermatozoides de pacientes saudáveis e até 65% em pacientes com linfoma, sarcoma e carcinoma (Hallak et al., 1998, Hallak et al., 2000b, Hallak et al., 2000c), o presente estudo observou redução da motilidade progressiva de 50,22 para 7,50% nas amostras pós-descongelamento, tornando estas amostras aptas apenas para a fertilização por ICSI (Palermo et al., 1992; Schlegel e Girardi 1997). Diversos parâmetros cinéticos importantes para a fertilização, como o VAP, VSL, VCL e LIN, também sofreram alterações com a criopreservação e corroboram com dados da literatura, que descrevem redução de 32% do VCL e 13% do LIN em amostras pós-descongelamento (Hallak et al., 1999). Verstegen et al. (2002) ao relacionar os parâmetros do CASA com a taxa de fertilidade, verificaram que os valores de VAP, VSL e VCL são significativamente maiores em amostras que produzem mais de 50% de oócitos fertilizados do que naquelas onde a taxa de fertilidade é menor que 50%. Amostras com valores maiores de LIN apresentam melhor migração e penetração no muco cervical, ou seja, os valores cinéticos de motilidade são positivamente correlacionados com as taxas de gestação, dados que confirmam a hipótese de que amostras pós-descongelamento tem poucas chances de serem utilizadas em procedimentos de reprodução assistida de baixa complexidade (Verstegen et al., 2002). A hiperatividade, característica de motilidade espermática que ocorre através de diversas modificações químicas dependentes de Ca^{2+} durante a capacitação e é correlacionada positivamente com taxas de

fertilização *in vitro*, uma vez que seu aumento facilita sua migração pelo muco cervical do trato feminino e para a fusão espermatozoide-oócito (Alasmari et al., 2013a), não foi afetada pela criopreservação no presente estudo. *In vivo*, a capacitação é modulada por peptídeos produzidos pela próstata e secretados no plasma seminal, que inibem a reação acrossômica até o espermatozoide entrar em contato com o oócito (Cockle 1995, Fraser 1998, Huang et al., 2003). A capacitação pode ser induzida em amostras *in vitro* com a elevação do pH (Alasmari et al., 2013a) e utilização de substâncias como a progesterona (Lishko et al., 2011; Strunker et al., 2011), timerosal (Alasmari et al., 2013b) e pentoxifilina (Alasmari et al., 2013a, Huang et al., 2003), substâncias não utilizadas no presente estudo.

A criopreservação das amostras do estudo indicou redução da atividade mitocondrial espermática, corroborando com o estudo de da Silva e colaboradores, que investigaram amostras pós-descongelamento de pacientes saudáveis e com lesão medular (da Silva et al., 2010). Diversas evidências sugerem que as mitocôndrias desempenham papel fundamental na manutenção de energia para a motilidade espermática, fator determinante para a fertilidade (Bunch et al., 1998; Ruiz-Pesini et al., 1998; Peña et al., 2003; Vemuganti et al., 2007). A presença de um comprimento mais curto e peça intermediária menos densa, por exemplo, são indicativos para astenozoospermia (Ruiz-Pesini et al., 1998). A perda oxidativa do DNA mitocondrial e da estrutura das membranas podem ser fatores de grande importância para explicar a diminuição da motilidade e potencial fértil de sêmen criopreservado, já que existe perda da produção de energia para suportar a motilidade (Ruiz-Pesini et al., 1998, Peña et al., 2003). Considerando ainda que espermatozoides são particularmente vulneráveis à ação de ROS produzidas no processo de criopreservação devido a sua grande concentração de ácidos graxos poli-insaturados, o estresse oxidativo induzido pelo congelamento e centrifugação observado

no presente estudo e descrito por diversos pesquisadores compromete a qualidade funcional dos espermatozoides devido ao aumento da peroxidação lipídica de membranas com consequente dano ao material genético, aumento da fragmentação de DNA e diminuição da atividade mitocondrial (Alvarez e Storey 1992, Luboshitzky et al., 2002, Paasch et al., 2004, Awad et al., 2006, Wang et al., 1997). Por isso, o grande desafio das pesquisas da reprodução humana assistida é melhorar a motilidade e função espermática em amostras pós-descongelamento.

Considerando tais alterações diretamente relacionados com estresse oxidativo, motilidade espermática e produção de energia e integridade do DNA, surge a necessidade de identificar agentes farmacológicos, vitaminas e antioxidantes que mantenham a integridade seminal após o descongelamento, tanto nos aspectos de mobilidade, quanto de função espermática, com objetivo de melhorar tais amostras ao ponto de realizar fertilização *in vitro* clássica ou inseminação artificial, descartando os riscos da ICSI e contribuindo para melhores resultados nas taxas de gestação.

Diversos antioxidantes são estudados a fim de otimizar a qualidade seminal. Com suplementação via oral, a vitamina E (α -tocofenol), vitamina C e coenzima Q₁₀ estão entre as substâncias estudadas que aumentam a motilidade progressiva e reduzem a peroxidação lipídica e fragmentação de DNA espermático (Kessopoulou et al., 1995, Suleiman et al., 1996, Greco et al., 2005, Lafuente et al., 2013, Agarwal et al., 2014). Na mesma linha, inúmeros estudos *in vitro* dedicam-se a estudar a ação de substâncias protetoras durante a criopreservação de espermatozoides, podendo citar a glutamina, que melhora a motilidade e capacidade fértil (Renard et al., 1996), catalase e ascorbato, que aumentam os percentuais de motilidade e reduzem a produção de ROS (Li et al., 2010), e a pentoxifilina (Esteves et al., 2007).

Como antioxidante, foi avaliado o papel da melatonina como agente protetor antes da criopreservação. A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é produzida e segregada pela glândula pineal durante a noite em resposta a mudanças ambientais nos níveis de luz, no entanto, evidências sugerem que a melatonina, bem como os seus metabólitos, está envolvida em outros processos importantes, tais como a proteção de diferentes tipos de células contra a morte induzida por dano, essas ações são prováveis devido aos seus efeitos antioxidantes, visto que ela ativa o sistema de antioxidantes enzimático (SOD, catalase, GPx) (Agarwal et al., 2014; Awad et al., 2006; Kleszczynski et al., 2011; Succu et al., 2011). O possível papel da melatonina na fertilidade masculina é bastante vago e controverso, embora diversos relatos sugiram que esta substância apresenta efeitos benéficos na qualidade seminal. Ortiz e colaboradores demonstraram que a concentração urinária do metabólito da melatonina, a 6-sulfatoximelatonina, é positivamente correlacionada com vários parâmetros seminais, incluindo concentração de espermatozoides, motilidade e morfologia, assim como correlacionada negativamente com o número de células redondas, que estão presentes no plasma seminal (Ortiz et al., 2011). No mesmo estudo, foi relatado que homens comprovadamente férteis (pais recentes) exibiram níveis mais elevados de melatonina e antioxidantes em comparação com homens inférteis e, ainda, efeitos benéficos *in vitro* para espermatozoides humanos foram observados (Ortiz et al., 2011). Karimfar e colaboradores (2015) realizaram a suplementação com diferentes concentrações de melatonina em amostras criopreservadas e observaram que com a incubação de 0,01mM de melatonina, as amostras apresentaram aumento da vitalidade, motilidade total e redução dos níveis de ROS e peroxidação lipídica (Karimfar et al., 2015). Entretanto, o presente estudo não observou qualquer efeito significativo nos parâmetros seminais e níveis de ROS avaliados pós-descongelamento com a suplementação das amostras seminais pré-criopreservação com

2 mM de melatonina. Estudos *in vitro* com sêmen de diversas espécies de animais indicam que a incubação com melatonina apresentou efeitos benéficos, como aumento significativo da porcentagem de motilidade progressiva, reduzindo simultaneamente a porcentagem de espermatozoides imóveis (du Plessis et al., 2010; Ortiz et al., 2011); redução da peroxidação lipídica de membrana de espermatozoides de javalis e garanhões (da Silva et al., 2011; Jang et al., 2010), prevenção da capacitação e efeitos apoptóticos, com aumento da fertilidade em amostras de carneiros (Casao et al., 2010); e proteção dos espermatozoides de búfalo contra os ROS e melhora da qualidade do sêmen após os processos de congelamento e descongelamento (Li et al., 2012). Frente a estes dados, o efeito protetor da melatonina torna-se inconclusivo, sugerindo que estudos dose-resposta de melatonina são necessários em amostras de espermatozoide humano.

Por outro lado, a suplementação de meios de criopreservação espermática com substâncias estimulantes visa especificamente à recuperação da motilidade pós-descongelamento em condições *in vitro*. Pertencente a família das metilxantinas, semelhante à cafeína, a pentoxifilina aumenta a motilidade e capacitação espermática devido ao seu efeito inibitório sobre a fosfodiesterase que, por sua vez, ajuda na manutenção de uma elevada concentração de AMPc intracelular, entretanto, um decréscimo na motilidade é observado com o aumento do tempo de incubação, que pode ser devida à falha da manutenção do nível citoplasmático desta molécula mensageira (Tournaye et al., 1993, Amer et al., 2013). No entanto, estudos sugerem efeitos tóxicos desta substância sobre o desenvolvimento de embriões (Tournaye et al., 1993, Scott e Smith 1995).

Ensaaios *in vitro* com cafeína, especificamente em amostras de sêmen humano criopreservadas, são escassas na literatura e os estudos com consumo de cafeína e

qualidade seminal ainda são contraditórios. Em estudo com 2554 homens jovens, alta ingestão de cafeína (>800mg/dia) e cola (>14 garrafas de 0,5 l por semana) foi associado com redução de número total e concentração espermática (Jensen et al., 2010). Em estudo prévio conduzido por nosso grupo com pacientes férteis (Sobreiro et al., 2005) foi demonstrado que o consumo de mais de seis xícaras de café por dia aumentou o número de espermatozoides móveis (62,4% vs. 57,1% grupo controle). Estudos em animais relatam que, quando adicionado ao sêmen bovino pós-descongelamento, a cafeína aumentou as taxas de gestação e inibiu a migração de leucócitos pelo lúmen do útero (Yamaguchi et al., 2009), aumentou a motilidade espermática e estimulou a capacitação e reação acrossômica espontânea dos espermatozoides (Yamaguchi e Funahashi, 2012).

Embora as taxas gerais de sobrevivência espermática pós-descongelamento apresentaram redução nas amostras, a incubação por 15 minutos com cafeína demonstrou aumento da motilidade progressiva e, quando a suplementação de cafeína foi associada com melatonina, elevação da atividade mitocondrial, sugerindo que a cafeína pode ter estimulado a produção de energia pelas mitocôndrias. Estes resultados corroboram com os relatos que envolveram espermatozoides de diferentes espécies animais, sugerindo que os efeitos da cafeína na motilidade espermática não são espécie-específicos (Garbers et al., 1971, Yamaguchi et al., 2009, Yamaguchi e Funahashi 2012). Em relação à concentração de cafeína utilizada no estudo, foi utilizada 2mM relatado em estudos prévios com amostras de animais humanos e que corresponde, aproximadamente, a concentração de aproximadamente meia xícara de café (75ml) (Pariz e Hallak, 2016; Ramlau-Hansen et al., 2008), entretanto, outras concentrações podem ser consideradas. A manutenção dos valores de hiperatividade nas amostras incubadas com cafeína sugere que esta substância não estimula a capacitação prematura. Além disso, não foi observado

prejuízo na integridade do DNA espermático e níveis de ROS após a adição de cafeína. Em resumo, podemos destacar que a utilização da cafeína nas amostras pós-descongelamento apresentou vantagens importantes na qualidade seminal, visto que mais que dobrou a porcentagem de motilidade progressiva pelo estímulo da atividade mitocondrial, sem aumentar os níveis de ROS e fragmentação de DNA dos espermatozoides. Ainda que os resultados sejam favoráveis, estudos que avaliem o efeito tóxico da cafeína no desenvolvimento embrionário ainda são necessários.

VI. CONCLUSÕES

Podemos concluir que:

- A incubação das amostras com cafeína aumentou a motilidade progressiva de espermatozoides pós-descongelamento;
- A incubação das amostras com melatonina pré-criopreservação e cafeína pós-descongelamento aumentou a motilidade progressiva e atividade mitocondrial dos espermatozoides pós-descongelamento,
- A cafeína e a melatonina não apresentaram efeitos na integridade do DNA espermático, hiperatividade e níveis de ROS.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal A, Durairajanayagam D, du Plessis SS. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014; 12: 112.

Agarwal A, Saleh RA. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urol Clin North Am*. 2002;29(4):817-27.

Agha-Rahimi A, Khalili MA, Nottola SA, Miglietta S, Moradi A. Cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa in new artificial seminal fluid. *Andrology*. 2016;4(6):1037-1044.

Aitken RJ, Warner PE, Reid C. Factors influencing the success of sperm-cervical mucus interaction in patients exhibiting unexplained infertility. *J Androl*. 1986a;7:3-10.

Aitken RJ, Mattei A, Irvine S. Paradoxical stimulation of human sperm motility by 2-deoxyadenosine. *J Reprod Fertil*. 1986b;78(2):515-527.

Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 1987;81(2): 459-469.

Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod*. 1989;40:183-97.

Aitken RJ, West KM. Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leukocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *Int J Androl*. 1990;3:433-51.

Aitken RJ, Irvine DS, Wu FC. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;164(2):542-51.

Aitken RJ, Fisher HM, Fulton N, et al. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. *Mol Reprod Dev.* 1997;47:468-82.

Aitken RJ, Roman SD. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid Med Cell Longev.* 2008;1(1):15-24.

Aitken RJ, de Iuliis GN. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* 2010; 16: 3–13.

Alasmari W, Barratt CL, Publicover SJ, Whalley KM, Foster E, Kay V, Martins da Silva S, Oxenham SK. The clinical significance of calcium-signalling pathways mediating human sperm hyperactivation. *Hum Reprod.* 2013a;28(4):866-76.

Alasmari W, Costello S, Correia J, Oxenham SK, Morris J, Fernandes L, Kirkman-Brown J, Michelangeli M, Publicover S, Barratt CLR. Ca^{2+} signalling through CatSper and Ca^{2+} stores generate different behaviours in human sperm. *J Biol Chem.* 2013b;288:6248–6258.

Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, et al. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa: superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl.* 1987;8:336-48.

Alvarez JG, Storey BT. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl.* 1992; 13(3): 232-241.

Amer MB, Metawae B, Hosny H, Raef A. Beneficial effect of adding pentoxifylline to processed semen samples on ICSI outcome in infertile males with mild and moderate asthenozoospermia: A randomized controlled prospective crossover study. *Iran J Reprod Med.* 2013;11(11): 939-944.

Archer SL, Roudebush WE. Enhancement of sperm motility using pentoxifylline and platelet-activating factor. *Methods Mol Biol.* 2013;927: 241-245.

Athayde KS, Cocuzza M, Agarwal A, Krajcir N, Lucon AM, Srougi M, Hallak J. Development of normal reference values for seminal reactive oxygen species and their correlation with leukocytes and semen parameters in a fertile population. *J Androl.* 2007;28(4): 613-620.

Awad H, Halawa F, Mostafa T, Atta H. Melatonin hormone profile in infertile males. *Int J Androl.* 2006;29(3): 409-413.

Benson JD, Woods EJ, Walters EM, Critser JK. The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology.* 2012; 78(8):1682-1699.

Blanco A, Zinkham WH. Lactate dehydrogenases in human testes. *Science.* 1963; 15;139(3555):601-2.

Blumer CG, Fariello RM, Restelli AE, Spaine DM, Bertolla RP, Cedenho AP. Sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity in men with varicocele. *Fertil Steril.* 2008;90(5):1716-22.

Bogle OA, Kumar K, Attardo-Parrinello C, Lewis SE, Estanyol JM, Ballescà JL, Oliva R. Identification of protein changes in human spermatozoa throughout the cryopreservation process. *Andrology*. 2017;5(1):10-22.

Bostofte E, Serup J, Rebbe H. Relation between number of immobile spermatozoa and pregnancies obtained during a twenty-year follow-up period immobile spermatozoa and fertility. *Andrologia*. 1984;16(2):136-40.

Bostofte E, Serup J, Rebbe H. Relation between spermatozoa motility and pregnancies obtained during a twenty-year follow-up period spermatozoa motility and fertility. *Andrologia*. 1983;15(6):682-6.

Bourgeron T. Mitochondrial function and male infertility. *Results Probl Cell Differ*. 2000; 28: 187-210.

Bungum M, Bungum L, Giwercman A. Sperm chromatin structure assay (SCSA): a tool in diagnosis and treatment of infertility. *Asian J Androl*. 2011;13(1):69-75.

Bunch DO, Welch JE, Magyar PL, Eddy EM, O'Brien DA. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S protein distribution during mouse spermatogenesis. *Biol Reprod*. 1998;58(3):834-41.

Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, Giwercman A. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod*. 2007;22(1):174-9.

Calvin HI, Cooper GW, Wallace E. Evidence that selenium in rat sperm is associated with a cystein-rich structural protein of the mitochondrial capsule. *Gamete Res*. 1981; 4:139–149.

Casao A, Mendoza N, Pérez-Pé R, Grasa P, Abecia JA, Forcada F, Cebrián-Pérez JA, Muino-Blanco T. Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate. *J Pineal Res.* 2010; 48(1): 39-46.

Cockle SM. Fertilization promoting peptide: a novel peptide, structurally similar to TRH, with potent physiological activity. *J Endocrinol.* 1995;146:3–8.

Cocuzza M, Athayde KS, Alvarenga C, Srougi M, Hallak J. Grade 3 varicocele in fertile men: a different entity. *J Urol.* 2012;187(4): 1363-1368.

Cocuzza M, Athayde KS, Agarwal A, Sharma R, Pagani R, Lucon AM, Srougi M, Hallak J. Age-related increase of reactive oxygen species in neat semen in healthy fertile men. *Urology.* 2008;71(3): 490-494.

Craft I, Tsirigotis M, Bennett V, Taranissi M, Khalifa Y, Hogewind G, et al. Percutaneous epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection in the management of infertility due to obstructive azoospermia. *Fertil Steril.* 1995;63:1038–42.

da Silva BF, Borrelli M Jr, Fariello RM, Restelli AE, Del Giudice PT, Spaine DM, Bertolla RP, Cedenho AP. Is sperm cryopreservation an option for fertility preservation in patients with spinal cord injury-induced anejaculation?. *Fertil Steril.* 2010;94(2): 564-573.

da Silva CM, Macías-García B, Miró-Morán A, González-Fernández L, Morillo-Rodríguez A, et al. Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes in stallion spermatozoa. *J Pineal Res.* 2011;51(2):172-9.

de Lamirande E, Gagnon C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radic Biol Med.* 1993;14(2):157-66.

De Leeuw FE, Chen HC, Colenbrander B, Verkleij AJ. Cold induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology.* 1990 ;27(2):171-83.

Dohle GR, Ramos L, Pieters MH, Braat DD, Weber RF. Surgical sperm retrieval and intracytoplasmic sperm injection as treatment of obstructive azoospermia. *Hum Reprod.* 1998;13(3):620-3.

Duru NK, Morshedi M, Oehninger S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil Steril.* 2000;74:1200-7.

du Plessis SS, Hagenaar K, Lampiao F. The in vitro effects of melatonin on human sperm function and its scavenging activities on NO and ROS. *Andrologia.* 2010;2(2): 112-116.

Eddy EM, Toshimori K & O'Brien DA. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc Res Tech.* 2003;61(1):103-15.

Esteves SC, Spaine DM, Cedenho AP. Effects of pentoxifylline treatment before freezing on motility, viability and acrosome status of poor quality human spermatozoa cryopreserved by the liquid nitrogen vapor method. *Braz J Med Biol Res.* 2007;40(7): 985-992.

Evenson DP, Higgins PH, Grueneberg D, et al. Flow cytometric analysis of mouse spermatogenic function following exposure to ethylnitrosourea. *Cytometry.* 1985;6:238–

Evenson DP, Wixon R. Comparison of the Halosperm test kit with the sperm chromatin structure assay (SCSA) infertility test in relation to patient diagnosis and prognosis. *Fertil Steril*. 2005;84(4):846-9.

Evenson DP. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Anim Reprod Sci*. 2016;169:56-75.

Fariello RM, Pariz JR, Spaine DM, Cedenho AP, Bertolla RP, Fraietta R. Association between obesity and alteration of sperm DNA integrity and mitochondrial activity. *BJU Int*. 2012a;110(6): 863-867.

Fariello RM, Pariz JR, Spaine DM, Gozzo FC, Pilau EJ, Fraietta R, Bertolla RP, Andreoni C, Cedenho AP. Effect of smoking on the functional aspects of sperm and seminal plasma protein profiles in patients with varicocele. *Hum Reprod*. 2012b; 27(11): 3140-3149.

Fedder J, Askjaer SA, Hjort T. Non-spermatozoal cells in semen: relationship to other semen parameters and fertility status of the couple. *Arch Androl*. 1993;31:95-103.

Ferramosca A, Provenzano SP, Coppola L, Zara V. Mitochondrial respiratory efficiency is positively correlated with human sperm motility. *Urology*. 2012;79(4): 809-814.

Fraser LR. The modulation of sperm function by fertilization promoting peptide. *Hum Reprod Suppl*. 1998;13:1-9.

Garbers DL, First NL, Sullivan JJ, Lardy HA. Stimulation and maintenance of ejaculated bovine spermatozoan respiration and motility by caffeine. *Biol Reprod*. 1971;5(3):336-9.

Gerez de Burgos NM, Gallina F, Burgos C, Blanco A. Effect of L-malate on pyruvate dehydrogenase activity of spermatozoa. *Arch Biochem Biophys*. 1994;308(2):520-4.

Gilmore JA, McGann LE, Liu J, Gao DY, Peter AT, Kleinhans FW, Critser JK. Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. *Biol Reprod*. 1995;53(5): 985-995.

Glazier DB, Marmar JL, Mayer E, Gibbs M, Corson SL. The fate of cryopreserved sperm acquired during vasectomy reversals. *J Urol*. 1999;161(2):463-6.

Goldberg E, Sberna D, Wheat TE, Urbanski GJ & Margoliash E. Cytochrome c: immunofluorescent localization of the testis-specific form. *Science*. 1977;196(4293):1010-2.

Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res*. 1993; 53: 1945–51.

Greco E, Romano S, Iacobelli M, Ferrero S, Baroni E, Minasi MG, Ubaldi F, Rienzi L, Tesarik J. ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment. *Hum Reprod*. 2005;20(9): 2590-2594.

Guthrie HD, Welch GR. Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology*. 2012;78(8):1700-8.

Hallak J, Hendin BN, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Investigation of fertilizing capacity of cryopreserved spermatozoa from patients with cancer. *J Urol*. 1998;159(4): 1217-1220.

Hallak J, Kolettis PN, Sekhon VS, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Cryopreservation of sperm from patients with leukemia: is it worth the effort? *Cancer*. 1999;85(9):1973-8.

Hallak J, Sharma RK, Fitzhugh MT, Agarwal A. Cryopreservation of Human Spermatozoa: Comparison of TEST-yolk buffer and Glycerol. *Int. J. Fertil. Women's Health Int J Fertil Womens Med*. 2000a;45(1):38-42.

Hallak J, Mahran A, Chae J, Agarwal A. The effects of cryopreservation on semen from men with sarcoma or carcinoma. *J Assist Reprod Genet*. 2000b;17(4): 218-221.

Hallak J, Mahran AM, Agarwal A. Characteristics of cryopreserved semen from men with lymphoma. *J Assist Reprod Genet*. 2000c 17(10): 591-594.

Henry MA¹, Noiles EE, Gao D, Mazur P, Critser JK. Cryopreservation of human spermatozoa IV. the effects of cooling rate, and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function. *Fertil Steril*. 1993;60(5):911-8.

Hrudka, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. *Int J Androl*. 1987;10(6): 809-828.

Huang PT, Chen SU, Chao KH, Chen CD, Ho HN, Yang YS. Effects of fertilization promoting peptide, adenosine, and pentoxifylline on thawed human sperm. *Arch Androl*. 2003;49(2):145-53.

Huang YF, Lu JC. Advances in standardization and quality control for the analysis of sperm quality parameters. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2007;13:963–968.

Huszar G, Sbracia M, Vigue L, Miller DJ, Shur BD. Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenetic maturation in men: relationship among plasma membrane beta 1,4-galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase, and creatine phosphokinase isoform ratios. *Biol Reprod.* 1997;56(4): 1020-1024.

Huttemann M, Jaradat S, Grossman LI. Cytochrome c oxidase of mammals contains a testes-specific isoform of subunit VIb—the counterpart to testes-specific cytochrome c? *Mol Reprod Dev.* 2003;66(1):8-16.

Jang HY, Kim YH, Kim BW, Park IC, Cheong HT, Kim JT, Park CK, Kong HS, Lee HK, Yang BK. Ameliorative effects of melatonin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on boar sperm characteristics and subsequent in vitro embryo development. *Reprod Domest Anim.* 2010;45(6): 943-950.

Jensen TK, Swan SH, Skakkebaek NE, Rasmussen S, Jørgensen N. Caffeine intake and semen quality in a population of 2,554 young Danish men. *Am J Epidemiol.* 2010;171(8): 883-891.

Jeulin C, Feneux D, Serrer C, Jouannet P, Guillet-Rosso F, Belaisch-Allat J, et al. Sperm factors related to failure of human in-vitro fertilization. *J Reprod Fertil.* 1986;76:735-44.

Jones R, Mann T, Sherins RJ. Adverse effects of peroxidized lipid on human spermatozoa. *Proc R Soc Lond B.* 1978;201:413– 417

Karimfar MH, Niazvand F, Haghani K, Ghafourian S, Shirazi R, Bakhtiyari S. The protective effects of melatonin against cryopreservation-induced oxidative stress in human sperm. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2015;8(1): 69-76.

Kessopoulou E, Powers HJ, Sharma KK, Pearson MJ, Russell JM, Cooke ID, Barratt CL. A double-blind randomized placebo cross-over controlled trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive oxygen species associated male infertility. *Fertil Steril*. 1995;64(4): 825-831.

Kleszczyński K, Hardkop LH, Fischer TW. Differential effects of melatonin as a broad range UV-damage preventive dermato-endocrine regulator. *Dermatoendocrinol*. 2011;3(1): 27-31.

Klonoff-Cohen H, Bleha J, Lam-Kruglick P. A prospective study of the effects of female and male caffeine consumption on the reproductive endpoints of IVF and gamete intra-Fallopian transfer. *Hum Reprod*. 2002;17(7): 1746-1754.

Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril*. 1997;68(3):519-24.

Krisfalusi M, Miki K, Magyar PL, O'Brien DA. Multiple glycolytic enzymes are tightly bound to the fibrous sheath of mouse spermatozoa. *Biol Reprod*. 2006;75(2):270-8.

Lafuente R, González-Comadrán M, Solà I, López G, Brassesco M, Carreras R, Checa MA. Coenzyme Q10 and male infertility: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet*. 2013;30(9): 1147-1156.

Li XX, Yang XG, Lu YQ, Lu SS, Zhang M, Yao HI, Meng LJ, Lu KH. Protective effects of melatonin against oxidative stress in flow cytometry-sorted buffalo sperm. *Reprod Domest Anim*. 2012;47(2): 299-307.

Li Z, Lin Q, Liu R, Xiao W, Liu W. Protective effects of ascorbate and catalase on human spermatozoa during cryopreservation. *J Androl*. 2010;31(5): 437-444.

Lishko PV, Botchkina IL, Kirichok Y. Progesterone activates the principal Ca^{2+} channel of human sperm. *Nature*. 2011;17;471(7338):387-91.

Luboshitzky R, Shen-Orr Z, Nave R, Lavi S, Lavie P. Melatonin administration alters semen quality in healthy men. *J Androl*. 2002;23(4): 572-578.

Luo SM, Schatten H, Sun QY. Sperm mitochondria in reproduction: good or bad and where do they go? *J Genet Genomics*. 2013;40(11): 549-556.

Mahadevan MM, Trounson AO. Relationship of fine structure of sperm head to fertility of frozen human semen. *Fertil Steril*. 1984;41(2):287-93.

Mazur P, Leibo SP, Chu EH. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Exp Cell Res*. 1972;71:345–55.

Meseguer M, Garrido N, Remohí J, Pellicer A, Simón C, Martínez-Jabaloyas JM, Gil-Salom M. Testicular sperm extraction (TESE) and ICSI in patients with permanent azoospermia after chemotherapy. *Hum Reprod*. 2003;18(6):1281-5.

Morris ID, Ilott S, Dixon L, Brison DR. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod*. 2002; 17: 990–8.

Mortimer D, Pandya IJ, Sawers RS. Relationship between human sperm motility characteristics and sperm penetration into human cervical mucus in vitro. *J Reprod Fertil*. 1986;78:93-102.

Mortimer ST, van der Horst G, Mortimer D. The future of computer-aided sperm analysis. *Asian J Androl*. 2015;17(4):545-53.

Nangia AK, Krieg SA, Kim SS. Clinical guidelines for sperm cryopreservation in cancer patients. *Fertil Steril*. 2013;100(5):1203-9.

Oettle EE, Soley JT. Ultrastructural changes in the acrosome of human sperm during freezing and thawing: a pilot trial. *Arch Androl*. 1986;17(2):145-50.

Okuyama M, Isogai S, Saga M, Hamada H, Ogawa S. In vitro fertilization (IVF) and artificial insemination (AI) by cryopreserved spermatozoa in mouse. *J Fertil Implants*. 1990;7:116 –9.

Ortiz A, Espino J, Bejarano I, Lozano GM, Monllor F, García JF, Pariente JA, Rodríguez AB. High endogenous melatonin concentrations enhance sperm quality and short-term in vitro exposure to melatonin improves aspects of sperm motility. *J Pineal Res*. 2011;50(2): 132-139.

Otasevic V, Korac A, Vucetic M, Macanovic B, Garalejic E, et al. Is manganese (II) pentaazamacrocyclic superoxide dismutase mimic beneficial for human sperm mitochondria function and motility? *Antioxid Redox Signal*. 2013;18(2): 170-178.

Paasch U, Sharma RK, Gupta AK, Grunewald S, Mascha EJ, Thomas AJ Jr, Glander HJ, Agarwal A. Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation

of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Biol Reprod.* 2004;71(6): 1828-1837.

Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet.* 1992; 340(8810):17-8.

Pariz JR, Hallak J. Effects of caffeine supplementation in post-thaw human semen over different incubation periods. *Andrologia.* 2016;48(9):961-966.

Pedersen H, Lebech PE. Ultrastructural changes in the human spermatozoon after freezing for artificial insemination. *Fertil Steril.* 1971;22(2):125-33.

Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez Martinez H. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim Reprod Sci.* 2003;78(1-2): 85-98.

Pedersen H, Lebech PE. Ultrastructural changes in the human spermatozoon after freezing for artificial insemination. *Fertil Steril.* 1971;22(2):125-33.

Peterson RN, Freund M. ATP synthesis and oxidative metabolism in human spermatozoa. *Biol Reprod.* 1970;3(1):47-54.

Piomboni P, Focarelli R, Stendardi A, Ferramosca A, Zara V. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *Int J Androl.* 2012;35(2): 109-124.

Pizzol D, Bertoldo A, Foresta C. Male infertility: biomolecular aspects. *Biomol Concepts.* 2014;5(6):449-56.

Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*. 1949;164(4172):666.

Pursel VG, Johnson LA. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J Anim Sci*. 1975;40:99 –102.

Ramakrishnan S, Rajesh M, Sulochana KN. Eales' disease: oxidant stress and weak antioxidant defence. *Indian J Ophthalmol*. 2007;55(2): 95-102.

Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Bonde JP, Olsen J, Bech BH. Semen quality according to prenatal coffee and present caffeine exposure: two decades of follow-up of a pregnancy cohort. *Hum Reprod*. 2008;23(12): 2799-2805.

Renard P1, Grizard G, Griveau JF, Sion B, Boucher D, Le Lannou D. Improvement of motility and fertilization potential of postthaw human sperm using glutamine. *Cryobiology*. 1996;33(3): 311-319.

Royere D, Hamamah S, Nicolle JC, Barthelemy C, Lansac J. Freezing and thawing alter chromatin stability of ejaculated human spermatozoa: fluorescence acridine orange staining and Feulgen-DNA cytophotometric studies. *Gamete Res*. 1988;21(1):51-7.

Royere D, Barthelemy C, Hamamah S, Lansac J. Cryopreservation of spermatozoa: a 1996 review. *Hum Reprod Update*. 1996;2(6): 553-559.

Ruiz-Pesini E, Diez C, Lapeña AC, Pérez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, Arenas J, López-Pérez MJ. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. *Clin Chem*. 1998;44(8 Pt 1): 1616-1620.

Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril*. 2010;93(4):1027-36.

Schlegel PN, Girardi SK. Clinical review 87: In vitro fertilization for male factor infertility. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(3): 709-716.

Scott L, Smith S. Human sperm motility-enhancing agents have detrimental effects on mouse oocytes and embryos. *Fertil Steril*. 1995;63(1): 166-175.

Sermondade N, Massin N, Boitrelle F, Pfeffer J, Eustache F, Sifer C, Czernichow S, Lévy R. Sperm parameters and male fertility after bariatric surgery: three case series. *Reprod Biomed Online*. 2012;24(2):206-10.

Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*. 1996;48(6): 835-850.

Sherman, J.K. (1986). Current status of clinical cryobanking of human semen. In: Paulson, J. D., Negro-Vilar, A., Lucena, E., Martini, L. (Eds). *Andrology: Male Fertility and Sterility* (pp. 5174-49). New York (NY, USA): Academic Press.

Song Y, Sharp R, Lu F, Hassan M. The future potential of cryopreservation for assisted reproduction. *Cryobiology*. 2010;60(3 Suppl):S60-5.

Shih DJ, Northcott PA, Remke M, Korshunov A, Ramaswamy V, et al. Cytogenetic prognostication within medulloblastoma subgroups. *J Clin Oncol*. 2014;32(9): 886-896.

Sobreiro BP, Lucon AM, Pasqualotto FF, Hallak J, Athayde KS, Arap S. Semen analysis in fertile patients undergoing vasectomy: reference values and variations according to

age, length of sexual abstinence, seasonality, smoking habits and caffeine intake. *Sao Paulo Med J.* 2005;123(4): 161-166.

Stanic P, Tandara M, Sonicki Z, Simunic V, Radakovic B, Suchanek E. Comparison of protective media and freezing techniques for cryopreservation of human semen. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2000;91(1): 65-70.

Stephoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet.* 1978; 2(8085):366.

Strünker T, Goodwin N, Brenker C, Kashikar ND, Weyand I, Seifert R, Kaupp UB. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca^{2+} influx in human sperm. *Nature.* 2011;471(7338):382-6.

Succu S, Berlinguer F, Pasciu V, Satta V, Leoni GG, Naitana S. Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. *J Pineal Res.* 2011;50(3): 310-318.

Suleiman SA, Ali ME, Zaki ZM, el-Malik EM, Nasr MA. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *J Androl.* 1996;17(5): 530-537.

Tada N, Sato M, Yamanoi J, Mizorogi T, Kasai K, Ogawa S. Cryopreservation of mouse spermatozoa in the presence of raffinose and glycerol. *J Reprod Fertil.* 1990;89:511– 6.

Tomlinson M, Meadows J, Kohut T, Haoula Z, Naeem A, Pooley K1, Deb S. Review and follow-up of patients using a regional sperm cryopreservation service: ensuring that resources are targeted to those patients most in need. *Andrology.* 2015;3(4):709-16.

Tournaye H, Van der Linden M, Van den Abbeel E, Devroey P, Van Steirteghem A. Effects of pentoxifylline on in-vitro development of preimplantation mouse embryos. *Hum Reprod.* 1993;8(9): 1475-1480.

Tulandi T, Gosden RG. Preservation of Fertility. 1ª Edição. Londres: Taylor & Francis; 2004.

Tunc O, Bakos HW, Tremellen K. Impact of body mass index on seminal oxidative stress. *Andrologia.* 2011;43(2): 121-128.

Turner RM. Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? *J Androl.* 2003;24(6): 790-803.

Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, Flohe L. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science.* 1999; 285:1393–1396.

Vemuganti SA, Bell TA, Scarlett CO, Parker CE, de Villena FP, O'Brien DA. Three male germline-specific aldolase A isozymes are generated by alternative splicing and retrotransposition. *Dev Biol.* 2007;309(1):18-31.

Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology.* 2002;57(1):149-79.

Villegas J, Kehr K, Soto L, Henkel R, Miska W, Sánchez R. Reactive oxygen species induce reversible capacitation in human spermatozoa. *Andrologia.* 2003;35(4): 227-232.

Wang AW, Zhang H, Ikemoto I, Anderson DJ, Loughlin KR. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology.* 1997;49(6): 921-925.

Williams DH. Fertility preservation in the male with cancer. *Curr Urol Rep*. 2013;14(4):315-26.

World Health Organization: Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5^a Edição. Geneva: WHO Press; 2010.

Yamaguchi S, Funahashi H, Murakami T. Improved fertility in gilts and sows after artificial insemination of frozen-thawed boar semen by supplementation of semen extender with caffeine and CaCl₂. *J Reprod Dev*. 2009;55(6):645-9.

Yamaguchi S, Funahashi H. Effect of the addition of beta-mercaptoethanol to a thawing solution supplemented with caffeine on the function of frozen-thawed boar sperm and on the fertility of sows after artificial insemination. *Theriogenology*. 2012;77(5): 926-932.

Zribi N, Feki Chakroun N, El Euch H, Gargouri J, Bahloul A, Ammar Keskes L. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil Steril*. 2010;93(1): 159-166.

ANEXO I. Carta de autorização para realização dos procedimentos no Laboratório Androscience.

androscience
LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA EM ANDROLOGIA, CRIOPRESERVAÇÃO E REPRODUÇÃO MASCULINA

São Paulo, 07 de Fevereiro de 2013.

Ilmo. Sr.

Avaliador do Comitê de Ética em Pesquisa,

A **Androscience Clínica e Laboratório de Referência em Andrologia, Criopreservação e Reprodução Humana Ltda EPP**, autoriza a aluna **Juliana Risso Pariz**, candidata à vaga de Doutorado da Disciplina de Urologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, a realizar procedimentos experimentais destinados a sua tese de Doutorado nas dependências da clínica, no período de Janeiro de 2013 a Dezembro de 2016.

DR. JORGE HALLAK
Urologia
CRM-SP: 85473

Dr. Jorge Hallak

Diretor científico Androscience

ANEXO II. Aprovação do projeto de pesquisa no Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **27/02/2013**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **031/13** intitulado: **“AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE MELATONINA, CAFEÍNA, GUARANÁ (PAULLINIA CUPANA) E RESVERATROL NOS PARÂMETROS FUNCIONAIS DE ESPERMATOZÓIDES SUBMETIDOS A CRIOPRESERVAÇÃO”** apresentado pelo Departamento de Cirurgia

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Dr. Jorge Hallak

Pesquisador (a) Executante: Juliana Risso Pariz

CEP-FMUSP, 04 de Março de 2013.

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO III. Termo de consentimento livre e esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Caixa Postal, 8091 - São Paulo - Brasil

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº. : SEXO : M () F ()
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M () F ()
- DATA NASCIMENTO.:/...../.....
- ENDEREÇO: Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA - AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE MELATONINA, CAFEÍNA, GUARANÁ (*Paullinia cupana*) E RESVERATROL NOS PARÂMETROS FUNCIONAIS DE ESPERMATOZÓIDES SUBMETIDOS A CRIOPRESERVAÇÃO
2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Dr. Jorge Hallak
CARGO/FUNÇÃO: Médico
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 65473
UNIDADE DO HCFMUSP: Divisão de Clínica Urológica
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
- (X) SEM RISCO () RISCO BAIXO () RISCO MÍNIMO
- () RISCO MÉDIO () RISCO MAIOR
- (probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 36 meses

Dr. JORGE HALLAK
CRM 65473

ANEXO III. Termo de consentimento livre e esclarecido (continuação)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Caixa Postal, 3391 - São Paulo - Brasil

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

A criopreservação de sêmen humano tem sido amplamente utilizada como método de preservação de fertilidade, podendo ser descongelada anos depois para utilização de gametas nos programas de Reprodução Assistida. Devido aos diversos danos causados à integridade dos espermatozoides durante o processo de criopreservação, o presente estudo tem como objetivo avaliar a função antioxidante e/ou estimulante da melatonina, cafeína, guaraná e resveratrol durante o congelamento de amostras seminais. Para isso, será realizada uma coleta de sêmen por masturbação para análise seminal de rotina realizado no laboratório. Todos os procedimentos serão realizados se houver necessidade durante o acompanhamento clínico do paciente. Nenhum procedimento será realizado apenas para fins de pesquisa. Caso a amostra se enquadre nas condições do estudo, será submetida a testes que avaliam a qualidade estrutural e funcional dos espermatozoides antes e após a criopreservação, a fim de verificar o efeito das substâncias adicionadas nos seguintes parâmetros: Avaliação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, determinação dos níveis de radicais livres de oxigênio, avaliação da integridade do DNA, determinação dos níveis de creatina kinase, avaliação da atividade mitocondrial. Após a execução dos procedimentos, as amostras serão descartadas.

A sua participação não oferecerá quaisquer danos e riscos referentes à vida social, sexual e mental. O Sr. apenas terá o desconforto da coleta do sêmen, havendo total isenção de ônus da sua parte. A determinação de um método eficaz de congelamento de espermatozoides poderá beneficiar a preservação da fertilidade masculina.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Estou ciente que posso ter acesso a qualquer tempo às informações sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa.
2. Estou ciente de que não sou obrigado a participar deste estudo e de que a minha participação ou não no mesmo é uma decisão voluntária. Estou ciente também de que estou livre para voltar atrás na minha decisão de autorizar a participação neste estudo em qualquer instante.
3. Estou ciente de que as informações a respeito dos meus exames são mantidas em sigilo e protegida no arquivo de prontuário do Laboratório Androscience. A liberação ou publicação de informações que identificam pacientes é proibida.
4. Estou ciente de que terei assistência médica garantida no HCFMUSP por eventuais danos à saúde decorrentes da minha participação neste estudo.

Dr. JOÃO DE HALLIX
Médico
CRM 30725/173

ANEXO III. Termo de consentimento livre e esclarecido (continuação)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Caixa Postal, 6061 - São Paulo - Brasil

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

JULIANA RISSO PARIZ
RUA JOAQUIM FLORIANO, 533 - CJ 904 - LABORATÓRIO ANDROSCIENCE
TEL: (11) 3073-0623

DR. JORGE HALLAK
AV. DR. ENÉAS DE CARVALHO AGUIAR, 255 - 7º ANDAR
TEL: (11) 3069-8080

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

AV. DR. ARNALDO, 455 - CERQUEIRA CÉSAR - SÃO PAULO - SP
CEP: 01246-903
TEL: (11) 3061-8004

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, 20 de 11 de 2012

assinatura do sujeito da pesquisa
ou responsável legal

DR. JORGE HALLAK

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

ANEXO IV. Valores mínimos aceitáveis para as variáveis do sêmen e nomenclatura para diagnóstico da análise seminal.

Valores mínimos aceitáveis para as variáveis do sêmen (percentil 5%).

Parâmetro espermático	Valores normais
Volume	$\geq 1,5$ ml
pH	$\geq 7,2 - 8,0$
Nº total de espermatozoides	39 milhões
Concentração espermática	$\geq 15 \times 10^6$ espermatozoides por mililitro de sêmen
Motilidade total	$\geq 40\%$ (progressivos + não progressivos)
Motilidade progressiva	$\geq 32\%$
Morfologia normal	$\geq 4\%$ com formas normais
Vitalidade	58% de espermatozoides vivos
Leucócitos	$< 1 \times 10^6$ por mililitro de sêmen

Nomenclatura para diagnóstico da qualidade seminal.

Parâmetro avaliado	Definição
Normozoospermia	Sêmen sem alterações, de acordo com o percentil 5% estabelecido pela Organização Mundial da Saúde
Oligozoospermia	Concentração de espermatozoides menor que $15 \times 10^6/\text{ml}$
Astenozoospermia	Motilidade total $< 40\%$ ou motilidade progressiva $< 32\%$
Teratozoospermia	Menos que 4% de espermatozoides com morfologia normal
Oligoastenozoospermia	Significa distúrbio em todas as três variáveis (combinações de apenas dois prefixos podem ser usadas também)
Azoospermia	Ausência de espermatozoides no ejaculado
Aspermia	Ausência de ejaculado

ANEXO V. Lista de reagentes e soluções utilizados no estudo

Sigla	Nome do reagente/solução	Fabricante
DAB	3'3-diaminobenzidina	Sigma-Aldrich
DMSO	Dimetilsulfóxido	Sigma-Aldrich
K ₂ HPO ₄	Fosfato de Potássio dibásico	Sigma-Aldrich
KCl	Cloreto de Potássio	Sigma-Aldrich
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de Sódio dibásico	Sigma-Aldrich
NaCl	Cloreto de Sódio	Sigma-Aldrich
TYB	<i>Test Yolk Buffer</i>	Irvine Scientific
HTF modificado	<i>Human tubal fluid</i> modificado	Irvine Scientific
SSS	Soro substituto sintético	Irvine Scientific
CAF	Cafeína	Sigma-Aldrich
MEL	Melatonina	Sigma-Aldrich
NaCl	Cloreto de sódio	Sigma-Aldrich
KCl	Cloreto de potássio	Sigma-Aldrich
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio dibásico	Sigma-Aldrich
KH ₂ PO ₄	Fosfato de monopotássio	Sigma-Aldrich
-	Luminol	Sigma-Aldrich
Tris-HCl	Tris-Hidroclorito	Sigma-Aldrich
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético	Sigma-Aldrich
-	Triton X	Sigma-Aldrich
-	Laranja de acridina	Polysciences
-	Ácido cítrico	Sigma-Aldrich

ANEXO VI. Determinação do tempo de incubação com cafeína publicado na revista Andrologia em 2016.

First International Journal of Andrology

ANDROLOGIA

ORIGINAL ARTICLE

Effects of caffeine supplementation in post-thaw human semen over different incubation periods

J. R. Pariz^{1,2,3} & J. Hallak^{1,2,3}

1 Androscience – High Complexity Clinical and Research Andrology Laboratory, São Paulo, Brazil;

2 Sector of Andrology, Department of Urology, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil;

3 Unit of Reproductive Toxicology, Department of Pathology, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Keywords

Caffeine—cryopreservation—mitochondria—sperm motility—*spermatozoa*

Correspondence

Juliana Risso Pariz, Laboratório Androscience, Rua Joaquim Floriano, 533 cj 904, Itaim Bibi – São Paulo, SP 04534-011, Brazil.

Tel./Fax: +55 11 3073 0623;

E-mails: juliana_rp@hotmail.com;

lab@androscience.com.br

Accepted: November 25, 2015

doi: 10.1111/and.12538

Summary

This study aimed to evaluate the effects of caffeine supplementation in post-cryopreservation human semen over different incubation periods. After collection by masturbation, 17 semen samples were analysed according to World Health Organization criteria, processed and cryopreserved with TEST-yolk buffer (1 : 1) in liquid nitrogen. After a thawing protocol, samples were incubated with 2 mM of caffeine for 0, 5, 15, 30 or 60 min, followed by analysis of motility and mitochondrial activity using 3,3'-diaminobenzidine (DAB). Mean variance analysis was performed, and $P < 0.05$ was the adopted significance threshold. Samples incubated for 15 min showed increased progressive motility compared to other periods of incubation, as well as a reduced percentage of immotile spermatozoa ($P < 0.05$). In samples incubated for 5 min, increased mitochondrial activity above 50% was observed (DABI and DABII). Although cryosurvival rates were low after the cryopreservation process, incubation with caffeine was associated with an increase in sperm motility, particularly 15-min incubation, suggesting that incubation with caffeine can be an important tool in patients with worsening seminal quality undergoing infertility treatment.